

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Bioplataformas electroanalíticas para (multi)detección de marcadores,
factores de virulencia y bacterias de relevancia clínica y alimentaria**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Berta Esteban Fernández de Ávila

Directores

José Manuel Pingarrón Carrazón
María Pedrero Muñoz
Susana Campuzano Ruiz

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**BIOPLATAFORMAS ELECTROANALÍTICAS PARA
(MULTI)DETECCIÓN DE MARCADORES, FACTORES DE
VIRULENCIA Y BACTERIAS DE RELEVANCIA CLÍNICA Y
ALIMENTARIA**

Directores:

Dr. José Manuel Pingarrón Carrazón

Catedrático de la U.C.M.

Dra. María Pedrero Muñoz

Profesora Titular de la U.C.M.

Dra. Susana Campuzano Ruiz

Profesora Ayudante Doctor de la U.C.M.

TESIS DOCTORAL PRESENTADA POR:

BERTA ESTEBAN FERNÁNDEZ DE ÁVILA

MADRID, 2014



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

DOÑA MARÍA ANTONIA PALACIOS CORVILLO, CATEDRÁTICA Y DIRECTORA DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

HACE CONSTAR:

Que el trabajo titulado *“Bioplataformas electroanalíticas para (multi)detección de marcadores, factores de virulencia y bacterias de relevancia clínica y alimentaria”* ha sido realizado bajo la dirección de los Doctores **José Manuel Pingarrón Carrazón, María Pedrero Muñoz y Susana Campuzano Ruiz**, profesores de dicho Departamento, constituyendo la Tesis Doctoral de su autora.

Madrid, 10 de abril de 2014

Fdo. María Antonia Palacios Corvillo

Fdo. José Manuel Pingarrón Carrazón

Fdo. María Pedrero Muñoz

Fdo. Susana Campuzano Ruiz

Fdo. Berta Esteban Fernández de Ávila

ÍNDICE

1. SUMMARY	1
1.1. INTRODUCTION	3
1.1.1. BACTERIA	3
1.1.1.1. Relevance in human health and determination	3
1.1.1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	3
1.1.1.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	3
1.1.2. CARDIAC BIOMARKERS	4
1.1.2.1. Relevance in human health	4
1.1.2.2. Diagnostic techniques.....	4
1.1.3. BIOSENSORS IN CLINICAL ANALYSIS: IMMUNOSENSORS AND GENOSENSORS	5
1.1.4. MAGNETIC BEADS IN BIOSENSORS DEVELOPMENT	5
1.2. AIMS OF THIS WORK	7
1.3. RESEARCH RESULTS	8
1.3.1. MAGNETOBIOSENSORS	8
1.3.1.1. Magnetobiosensors for <i>Streptococcus pneumoniae</i>	8
1.3.1.2. Magnetoimmunosensor for <i>Staphylococcus aureus</i>	9
1.3.1.3. Magnetoimmunosensor for cardiac troponin T	10
1.3.1.4. Magnetoimmunosensor for amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide	11
1.3.1.5. Magnetoimmunosensor for C reactive protein.....	12
1.3.1.6. Multiplexed magnetoimmunosensor for amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and C reactive protein.....	13
1.3.2. INTEGRATED BIOSENSORS.....	14
1.3.2.1. Integrated immunosensor for Lipoprotein-a.....	14
1.3.2.2. Integrated genosensor.....	14
1.4. MILESTONES	16

2. INTRODUCCIÓN	19
2.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	21
2.2. EMPLEO DE SENSORES EN EL ANÁLISIS CLÍNICO	24
2.3. MAGNETOSENSORES ELECTROQUÍMICOS DE DNA. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	44
2.4. MAGNETOINMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	56
2.5. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	67
2.5.1. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	74
2.5.2. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>	80
2.6. DETERMINACIÓN DE MARCADORES CARDIACOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	88
2.6.1. DETERMINACIÓN DE TROPONINA T CARDIACA	90
2.6.2. DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL AMINO TERMINAL	96
2.6.3. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA	100
2.6.4. DETERMINACIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA A	105
2.6.5. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MARCADORES CARDIACOS	109
3. PARTE EXPERIMENTAL	115
3.1. INSTRUMENTACIÓN	117
3.1.1. APARATOS	117
3.1.2. ELECTRODOS	120

3.2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS	123
3.2.1. REACTIVOS.....	123
3.2.2. DISOLUCIONES.....	129
3.2.3. MUESTRAS	138
 3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	 141
3.3.1. PRETRATAMIENTO Y MODIFICACIÓN DE LOS ELECTRODOS INDICADORES.....	141
3.3.2. INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Streptococcus pneumoniae</i> : PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE MEDIDAS	142
3.3.2.1. Magnetoinmunosensores.....	142
3.3.2.2. Magnetoinmunosensores basados en una estrategia inmuno-PCR	144
3.3.3. MAGNETOINMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i> : PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE MEDIDAS	146
3.3.4. INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES CARDIACOS: PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE MEDIDAS	148
3.3.4.1. Magnetoinmunosensores para la determinación de troponina T cardiaca	148
3.3.4.1.1. Dispositivo basado en el empleo de electrodos serigrafiados comerciales.....	149
3.3.4.1.2. Dispositivo basado en el empleo de un chip de Microfluídica.....	150
3.3.4.2. Magnetoinmunosensores para la determinación del péptido natriurético cerebral N-terminal	151
3.3.4.3. Magnetoinmunosensores para la determinación de la proteína C reactiva.....	153

3.3.4.4. Magnetoinmunosensores duales para la determinación simultánea del péptido natriurético cerebral N-terminal y de la proteína C reactiva	154
3.3.4.5. Inmunosensores integrados para la determinación de lipoproteína-a	156
3.3.5. PREPARACIÓN DE GENOSENSORES DE SUPERFICIE	158
3.3.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS	161
3.3.6.1. Determinación de <i>Streptococcus pneumoniae</i> en muestras de orina	161
3.3.6.2. Determinación de <i>Staphylococcus aureus</i> en muestras de leche.....	161
3.3.6.3. Determinación de troponina T cardiaca en suero humano	162
3.3.6.4. Determinación del péptido natriurético cerebral N-terminal en suero humano.....	163
3.3.6.5. Determinación de proteína C reactiva en un material de referencia.....	164
3.3.6.6. Determinación simultánea del péptido natriurético cerebral N-terminal y de la proteína C reactiva en un material de referencia.....	164
3.3.6.7. Determinación de lipoproteína-a en suero humano.....	165
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	167
4.1. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	170
4.1.1. DESARROLLO DE MAGNETOINMUNOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Streptococcus pneumoniae</i>	170
4.1.1.1. Elección del tipo de anticuerpo	172
4.1.1.2. Elección del tipo de configuración.....	173
4.1.1.3. Optimización de variables experimentales	174
4.1.1.4. Curvas de calibrado y características analíticas	179
4.1.1.5. Estudio de interferencias.....	181

4.1.1.6. Aplicación al análisis de muestras de orina	182
4.1.2. MAGNETOSENSORES BASADOS EN UNA ESTRATEGIA DE INMUNO-PCR	183
4.1.2.1. Obtención de amplicones mediante amplificación daPCR.....	184
4.1.2.2. Detección amperométrica de los amplicones daPCR.....	185
4.1.2.3. Curvas de calibrado y características analíticas	187
4.2. DESARROLLO DE MAGNETOINMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE <i>Staphylococcus aureus</i>.....	189
4.2.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES.....	191
4.2.2. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.....	196
4.2.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS	201
4.2.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE	202
4.3. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES CARDIACOS	204
4.3.1. MAGNETOINMUNOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE TROPONINA T CARDIACA.....	204
4.3.1.1. Optimización de variables experimentales	206
4.3.1.2. Características analíticas y estabilidad	213
4.3.1.3. Estudio de interferencias.....	215
4.3.1.4. Aplicación al análisis de muestras de suero humano enriquecidas.....	216
4.3.1.5. Determinación de troponina T cardiaca en flujo empleando un chip de microfluídica	218
4.3.1.5.1. Curva de calibrado y características analíticas.....	220
4.3.1.5.2. Aplicación al análisis de muestras de suero humano.....	221
4.3.2. MAGNETOINMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL N-TERMINAL	223
4.3.2.1. Optimización de variables experimentales	223
4.3.2.2. Características analíticas y estabilidad	227
4.3.2.3. Estudio de interferencias.....	229

4.3.2.4. Aplicación al análisis de muestras de suero humano.....	230
4.3.3. MAGNETOINMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA	233
4.3.3.1. Optimización de variables experimentales	233
4.3.3.2. Características analíticas y estabilidad	237
4.3.3.3. Estudio de interferencias.....	239
4.3.3.4. Aplicación al análisis de un material de referencia con un contenido certificado de la proteína	240
4.3.4. MAGNETOINMUNOSENSOR DUAL PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL N-TERMINAL Y DE LA PROTEÍNA C REACTIVA	243
4.3.4.1. Optimización de variables experimentales	243
4.3.4.2. Curvas de calibrado y características analíticas	246
4.3.4.3. Aplicación al análisis simultáneo del péptido natriurético cerebral N-terminal y de la proteína C reactiva en un material de referencia	249
4.3.5. INMUNOSENSOR INTEGRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIPOPROTEÍNA-A.....	252
4.3.5.1. Optimización de variables experimentales	253
4.3.5.2. Características analíticas y estabilidad	260
4.3.5.3. Estudio de interferencias.....	263
4.3.5.4. Aplicación al análisis de muestras de suero humano.....	264
4.4. GENOSENSORES DE SUPERFICIE. FACTORES DETERMINANTES DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE LA ESPECIFICIDAD	266
4.4.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA Sonda DE CAPTURA	269
4.4.2. EFECTO DEL VOLUMEN DE INCUBACIÓN DE LA Sonda DIANA.....	270
4.4.3. EFECTO DE LA LONGITUD DE LA CADENA DE LA Sonda DIANA.....	271
4.4.4. ESTUDIOS DE ESPECIFICIDAD.....	272
5. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	275
6. BIBLIOGRAFÍA.....	279

7. RESUMEN EN INGLÉS	297
8. PUBLICACIONES / PUBLISHED PAPERS	303
9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS.....	451

1. SUMMARY

1.1. INTRODUCTION

1.1.1. BACTERIA

1.1.1.1. Relevance in human health and determination

The control of pathogenic bacteria is very important because they are a major cause of human disease and mortality. Some organisms, such as *Staphylococcus* or *Streptococcus*, form part of the human flora, and are usually found in the skin or in the nose without causing disease, but in high concentrations, may eventually cause skin infections, pneumonia, meningitis and even sepsis. In this context, bacteria identification in food and clinical samples, and the rapid diagnosis of the respective bacterial diseases is very important to assure human health, which in the last years have led to a high development of bacteria analysis techniques, more rapid, sensitive and specific than the conventional methods. At the present time, the methodologies most used in the detection of bacteria are based on culturing and counting methods, immunological methodologies, and PCR.

1.1.1.2. *Streptococcus pneumoniae*

Streptococcus pneumoniae (*S. pneumoniae*) is an important human pathogen, being the cause of a large number of infections and severe invasive processes which, despite having an effective antibiotic treatment, represent some of the leading causes of morbidity and mortality, especially in sensitive populations as children, elderly and immunocompromised people. So, the accurate identification and rapid diagnosis of pneumococcal infections are critical to control these diseases.

1.1.1.3. *Staphylococcus aureus*

Another important pathogen, responsible of a great number of illnesses produced by the ingestion of contaminated food and other important diseases, is *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). This bacterium can grow up in severe conditions, such as high salt concentration levels or high temperatures, which make possible its appearance in a great range of foodstuffs. This fact explains the importance of the development of new analysis methodologies for its application in the food industry,

particularly important in the production of raw and cooked meat, milk and dairy products, which are mainly responsible for its transmission to humans.

1.1.2. CARDIAC BIOMARKERS

1.1.2.1. Relevance in human health

Cardiovascular diseases (CVDs) comprise the group of heart and blood vessels affections, and are the major cause of death among adults worldwide. There are different cardiac protein biomarkers (CBs) that serve as indicators of the produced disease, and could potentially add predictive value to establish risk factor sets. There is a wide range of CBs that can be analyzed simultaneously for the diagnosis of these CVDs. The most studied CBs are those related to the different mechanisms involved in the development and rupture of atherosclerotic plaque. The following CBs have been considered in this work: cardiac troponin T (cTnT), amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP), C- reactive protein (CRP) and lipoprotein-a (Lp(a)). All these CBs show very low clinical detection ranges (from pM to nM), so highly sensitive analytical methods are required for their determination.

1.1.2.2. Diagnostic techniques

Conventional tests implicated in the diagnosis of CVDs include electrocardiograms, enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIA), immunochromatographic tests, electrochemiluminescence (ECL) immunoassays and surface plasmon resonance (SPR), techniques that usually require long analysis times and high costs, and also lack of the needed sensitivity and stability. In this context, biosensors appear as a promising alternative diagnosis tool, because they can solve the problems of sensitivity, time and cost. Recently, biosensors based on "lab on a chip" (LOC) technology, "point of care testing" (POCT) devices and microfluidic systems, have been consolidated as good strategies for the design of devices for CBs diagnosis, as they combine the advantages of miniaturization and decentralization of the process. However, these approaches have still rarely been applied to the determination of cardiovascular markers and there is still a lot of work to do in order to bring biosensors from the laboratories to the market.

1.1.3. BIOSENSORS IN CLINICAL ANALYSIS: IMMUNOSENSORS AND GENOSENSORS

Electrochemical biosensors are playing an important role in the field of clinical analysis, as they are fast, low cost and allow the development of online measurement systems. Within the affinity biosensors group, immunosensors and genosensors are included, they being biosensors based on the use of antibodies (Abs) and DNA probes, respectively, as specific bioreceptors. Among the most commonly electrode materials used for the development of electrochemical biosensors, screen-printed electrodes (SPEs) stand out as electrochemical transducers mainly because this technology allows the mass production of very reproducible disposable and low cost sensors. On the other hand, one of the most important aspects in the construction of an electrochemical biosensor is the selection of the biomolecules immobilization method onto the electrode surface, which should allow an intimate contact between the bioreceptor and the transducer.

The combination of several disciplines such as biology, nanotechnology and electrochemistry should result in major advances in the field of electrochemical biosensors, which will allow their application to satisfy the demands of clinical analysis in real time.

1.1.4. MAGNETIC BEADS IN BIOSENSORS DEVELOPMENT

A high boost in the use of magnetic beads (MBs) as bioimmobilization platforms, biomolecular conveyors, separators and concentrators of various analytes, as well as to control electrochemical processes that occur at the electrode surfaces, has been originated during the last years. MBs constitute a versatile tool in the development of biosensors, as they provide a large surface area for attachment of various recognition elements and analytes, which can then be easily separated from the liquid phase by a magnet, and spread immediately to zoom out. The use of MBs greatly facilitates the preparation steps of the biosensor, and allows a reduction in the assay time, resulting designs that generally achieve better limits of detection (LDs) and lower matrix effects.

Taking into account their interesting properties and large commercial availability, different functionalized MBs have been used as immobilization surfaces in the development of the magnetobiosensors described in this research work.

1.2. AIMS OF THIS WORK

The main aim of this work was the design and development of novel electrochemical immunosensors, genosensors and analytical strategies, for the individual and multiplexed determination of different bacteria and cardiac CBs in food and clinical samples.

As introduced before, the presence of these bacteria and CBs in food and/or body fluids is of great relevance in human health, which explains the need to develop fast, simple, cost-effective, and reliable analytical systems for their detection and determination.

As it will be described, different electrochemical biosensors, based on the use of MBs, Abs, DNA and SPEs, have been implemented for the achievement of this goal. Moreover, the developed sensors have been applied to the analysis of the bacteria and CBs of study in food and serum samples.

1.3. RESEARCH RESULTS

The research work presented in this PhD Thesis, describes the successful development of several magnetobiosensors and integrated biosensors able to detect and quantify the bacteria and CBs mentioned above in food and clinical samples. Different bioreceptors (as specific antibodies and DNA probes), appropriate affinity assays, and innovative immobilization designs have been used to implement the biosensing systems. Validation of the prepared biosensors has also been successfully achieved.

1.3.1. MAGNETOBIOSENSORS

1.3.1.1. Magnetobiosensors for *Streptococcus pneumoniae*

A disposable amperometric magnetoimmunosensor based on the use of protein A functionalized MBs (ProtA-MBs) and screen-printed gold electrodes (SPAuEs) has been developed for the selective detection and quantification of *S. pneumoniae*. A specific Ab prepared against the 37 *S. pneumoniae* serotype was linked to ProtA-MBs and incubated with bacteria. The same Ab conjugated with horseradish peroxidase (HRP) was attached to the bacteria and the resulting modified MBs were captured by a magnetic field on the surface of the SPAuEs modified with tetrathiafulvalene (TTF). The amperometric response obtained at -0.15 V vs the silver pseudoreference electrode of the SPEs after the addition of H_2O_2 was used as transduction signal.

The LDs achieved, without pre-concentration or pre-enrichment steps, were 1.5×10^4 cfu mL^{-1} (colony forming units) and 6.3×10^5 cfu mL^{-1} for *S. pneumoniae* strains Dawn (serotype 37) and R6 (non-encapsulated), respectively. Relative standard deviation (RSD) values for the amperometric responses were 11.5 % and 6.4 %, respectively, results that reflect an acceptable reliability for the immunosensor construction procedure.

The developed methodology showed a good selectivity against closely related streptococci and against phylogenetically unrelated bacteria such as *Escherichia coli* (*E. coli*). The magnetoimmunosensor was shown to be suitable for detecting 1.0×10^4 cfu of *S. pneumoniae* in inoculated urine samples without any pretreatment,

demonstrating its usefulness for clinical analysis. The total analysis time of 3.5 h from sampling to measurement, the possibility to prepare up to 30 sensors per day and the use of small amounts of test solution for *S. pneumoniae* identification, constitute important advantages that also may make the developed methodology an improvement over blood cultures in achieving an early diagnosis and/or after antibiotic administration.

The sensitivity of the determination was improved with a magneto-electrochemical immunoassay approach coupled to direct asymmetric PCR (daPCR) of the bacteria attached to capture Ab-ProtA-MBs. DaPCR was used to amplify a characteristic 235-bp (base pair) region of the gene coding for the major pneumococcal autolysin (*lytA*). The predominantly single-stranded biotinylated amplicons obtained were subsequently hybridized onto streptavidin functionalized MBs (Strp-MBs) modified with a specific biotinylated 20-mer capture probe, and then bound to a Strp-HRP polymer. The electrochemical detection of the enzyme product was performed employing the same procedure described for the magnetoimmunosensor.

DaPCR amplicons could be obtained with only 20 cfu of *S. pneumoniae*, whereas no amplicon was obtained in the presence of high concentrations ($\approx 1.0 \times 10^8$ cfu mL⁻¹) of other streptococci. The developed methodology allowed an easy differentiation between 100 cfu mL⁻¹ *S. pneumoniae* cultures and the aPCR blank control.

Calibration curves were constructed for R6 and Dawn serotypes, with LDs of 132 and 130 cfu mL⁻¹, respectively, values that were approximately 100-1000 times lower than those obtained with disposable electrochemical magnetoimmunosensors without PCR amplification.

1.3.1.2. Magnetoimmunosensor for *Staphylococcus aureus*

A disposable amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of *Staphylococcal* ProtA and *S. aureus* has been developed. This sensor was based on the immobilization of specific Abs onto ProtA-MBs, followed by a competitive immunoassay involving ProtA labelled with HRP. The resulting modified MBs were captured by a magnetic field on the surface of TTF-SPAuEs, and the

amperometric response obtained at -0.15 V vs the silver pseudo-reference electrode of the SPEs after the addition of H_2O_2 was employed as transduction signal.

The sensitivity could be improved by subjecting bacteria cells to wall lyses in order to increase the availability of ProtA-bearing cell portions and their diffusion towards the Abs immobilized on the ProtA-MBs. Therefore, sonication was employed to partially extract ProtA from de *S. aureus* cells walls.

The developed methodology showed a very low LD (1 cfu *S. aureus* mL^{-1} of raw milk samples), and a good selectivity against the most commonly involved foodborne pathogens originating from milk (*E. coli* and *Salmonella choleraesuis*). These features, together with a short analysis time (2 h), the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation made the developed methodology a promising alternative in the development of devices for on-site analysis.

1.3.1.3. Magnetoimmunosensor for cardiac troponin T

A disposable amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of cTnT has also been implemented. The immunosensor design, based on a sandwich format, involved binding of Strp-MBs to a specific biotinylated capture Ab and detection with a HRP-labeled Ab. The resulting modified-MBs were magnetically captured on the surface of a SPAuE and the amperometric response obtained at -0.10 V upon addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and H_2O_2 was used to monitor the affinity reaction. Very low limits of detection and determination were achieved following this methodology, 0.017 and 0.05 ng mL^{-1} , respectively.

The reproducibility of the responses obtained with different magnetoimmunosensors was also evaluated. The amperometric measurements with seven different immunosensors prepared on the same day was evaluated at two cTnT concentration levels, 0.5 and 1 ng mL^{-1} , yielding RSD values of 7.1 and 2.1 %, respectively, which demonstrated that the fabrication procedure was reliable and that reproducible amperometric responses could be obtained with different immunosensors constructed in the same manner.

The proposed methodology allowed the detection and quantification of major elevations of cTnT reliably and rapidly (120 min), in diluted human serum samples or

heparinized plasma samples, meeting the criteria required to diagnose unequivocally acute myocardial infarction (AMI). Also, the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation made feasible its use as an alternative clinical diagnosis tool in the development of POC quantitative devices for on-site analysis of necrosis cardiac proteins.

A cyclo-olefin polymer-based (COP) microfluidic chip has been constructed for the detection of cTnT employing this developed magnetoimmunosensor. This microfluidic device was capable of capturing the modified MBs and performing chronoamperometric detection (-0.1 V vs a Ag pseudoreference electrode) in a series of gold electrodes. The biorecognition event was monitored using the H_2O_2 /TMB system and hence the measured signal corresponded to the chronoamperometric detection of the enzymatic reduction of H_2O_2 mediated by TMB. Successful determination of cTnT was accomplished in the clinically relevant range of 0.05 – 1.0 ng mL^{-1} , with very low limits of detection and determination (0.03 and 0.11 ng mL^{-1} , respectively) in PBS solutions. Also, the multielectrode platform was capable of detecting less than 1 ng mL^{-1} in a $1/50$ human serum dilution, demonstrating its potential as diagnosis tool.

1.3.1.4. Magnetoimmunosensor for amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide

A novel amperometric magnetoimmunosensor using an indirect competitive format has been developed for the sensitive detection of NT-proBNP. The immunosensor design involved the covalent immobilization of the Ag onto carboxylic-modified MBs (HOOC-MBs) activated with N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), and further incubation in a mixture solution containing variable concentrations of the Ag and a fixed concentration of an HRP-labeled detection Ab. Accordingly, the target NT-proBNP in the sample and that immobilized on the MBs competed for binding to a fixed amount of the specific HRP-labeled secondary Ab. The immunoconjugate-bearing MBs were captured by a magnet placed under the surface of a disposable SPAuE. The amperometric responses measured at -0.10 V (vs the Ag pseudoreference electrode),

upon addition of TMB as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate, were used to monitor the affinity reaction.

The developed magnetoimmunosensor provided attractive analytical characteristics in 10-times diluted human serum samples, exhibiting a linear range of clinical usefulness ($0.12\text{--}42.9 \text{ ng mL}^{-1}$) and a LD of 0.02 ng mL^{-1} , which can be used in clinical diagnosis of chronic heart failure in the elderly and for classifying patients at risk of death after heart transplantation. Cross-reactivity from other non-target proteins, as well as from heparin, was checked. Moreover, it was also demonstrated that their presence at their concentrations commonly found in serum or plasma samples did not significantly affect the NT-proBNP binding at the considered concentration levels.

The stability of the Ag-modified MBs was evaluated (storing the modified MBs in filtered PBST at 4°C) showing amperometric measurements inside the control limits during at least 12 days. These results supported the possibility of preparing and storing the conjugates until the immunoassays are to be carried out, which would allow carrying the modified MBs to the place where samples would be taken and performing the determination in situ.

1.3.1.5. Magnetoimmunosensor for C reactive protein

A highly sensitive magnetoimmunosensor for the determination of human CRP has been prepared. A sandwich format involving covalent immobilization of an antiCRP onto MBs activated with the EDC/sulfo-NHS system, the Ag-Ab reaction and incubation of the modified MBs with a biotin-antiCRP, was used. Furthermore, an incubation step with a Strp-HRP conjugate was employed to allow monitoring of the affinity reaction. The electrochemical detection procedure was the same as for the NT-proBNP magnetoimmunosensor.

The CRP magnetoimmunosensor exhibited a wide range of linearity extended between 0.07 and $1.0 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$ with a low LD of $(0.021 \pm 0.005) \text{ ng mL}^{-1}$. It should be emphasized that the achieved LD was 48000 times lower than the $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ minimal clinical threshold recommended in serum/plasma samples to predict a moderate risk of myocardial infarction and stroke. The reproducibility of the amperometric responses obtained with different sensors constructed following the

same protocol was evaluated by performing measurements for $5.0 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$ CRP. Results from nine different immunosensors prepared on the same day yielded an RSD value of 6.5 %.

The applicability of the developed magnetoimmunosensor for clinical diagnosis was successfully demonstrated by the analysis of a commercial serum with a certified CRP content. The analysis of ten diluted serum samples containing nominally 100 ng mL^{-1} CRP yielded a mean content of $(101 \pm 2) \text{ ng mL}^{-1}$.

The great analytical performance exhibited in combination with the use of disposable mass-produced biosensors constitutes important advantages for an easy integration of the presented methodology into portable and multiplexed formats.

1.3.1.6. Multiplexed magnetoimmunosensor for amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and C reactive protein

Taking advantage of the successful results obtained with the NT-proBNP and CRP magnetoimmunosensors, a rapid multiplexed magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of both CBs in human serum has been implemented. With this aim, specific capture Abs were covalently immobilized onto HOOC-MBs. The quantification of both CBs was performed by using different configurations, an indirect competitive format for NT-proBNP and a sandwich format for CRP, and HRP-labeled tracers. The use of screen-printed dual carbon electrodes (SPdCEs) allowed the achievement of simultaneous independent amperometric readout for each protein.

The developed methodology showed very low LDs (0.47 ng mL^{-1}). To evaluate the usefulness of the magnetoimmunosensor, an international standard for CRP serum (containing $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) spiked with 1.0 ng mL^{-1} NT-proBNP was analyzed. The analysis of six replicates of this sample yielded mean contents of $(1.02 \pm 0.04) \mu\text{g mL}^{-1}$ CRP and $(1.0 \pm 0.1) \text{ ng mL}^{-1}$ NT-proBNP, results that confirmed the suitability of the disposable dual magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of both CBs at clinically relevant concentration levels in serum.

1.3.2. INTEGRATED BIOSENSORS

1.3.2.1. Integrated immunosensor for lipoprotein-a

A novel strategy for the construction of a disposable integrated amperometric immunosensor for the sensitive and rapid determination of Lp(a) in human serum has been implemented using a sandwich format which involved the covalent immobilization of a specific antiLp(a) on the surface of a N-[N α ,N α -Bis(carboxymethyl)-L-lysine]-12-mercaptododecanamide (HS-NTA)-modified screen-printed carbon electrodes (SPCEs). After a blocking step with skimmed milk, the modified antiLp(a)-SPCEs were incubated with a mixture solution containing the target analyte and a fixed concentration of a specific biotin-antiLp(a) and a Strp-HRP conjugate. The amperometric responses of the resulting immunosensor at -0.10 V (vs a Ag pseudo-reference electrode) upon addition of TMB as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate, were used to monitor the extent of the immunoreactions.

The developed methodology exhibited a wide range of linearity between 0.005 and $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, a LD of $8 \times 10^{-4} \text{ mg dL}^{-1}$, well below the minimum cut-off value to predict the probability of cardiovascular risk (20 mg dL^{-1}), and also showed a great selectivity against other serum components. The usefulness of the Lp(a) immunosensor was demonstrated by analyzing spiked serum samples as well as a reference serum containing a certified Lp(a) content, obtaining very good results with an analysis time of only 45 min.

1.3.2.2. Integrated genosensor

A model electrochemical integrated DNA sensor has been developed to demonstrate that the determinants of the LD and the specificity of surface-based biosensors often are not dependent on the true affinity of the probe for its target, but simply on the effective probe concentration.

An electrochemical DNA sensor composed of a 27-base linear DNA probe covalently modified on the 3' terminus with the redox reporter methylene blue (MB), and on the 5' terminus with a long-chain alkane thiol, which enables chemi-absorption to the gold electrode surface via a gold-thiol bond, was employed. In the absence of a

complementary target, the probe's structure allows the redox reporter to move into proximity with the electrode, supporting efficient electron transfer. Upon hybridization to its target, the linear probe assumes a relatively rigid, double-stranded conformation that reduces the efficiency with which the reporter approaches the surface, reducing electron transfer rates, and decreasing the Faradic current observed when the sensor is interrogated using square wave voltammetry (SWV).

It was demonstrated that under the suppose that the observed affinity of reagentless surface-based biosensors is often defined by the effective probe concentration, the observed affinity (and thus the sensor's LD and specificity) will depend on the density with which the probes are packed on the surface of the sensor, the surface area, and even the volume of sample employed. Work in a so-called ligand-depletion regime, where the number of target molecules bound to the probe can be of similar magnitude to the total number in the sample, can lead to misinterpretation of observed affinity of surface-based sensors, and diminishes their specificity. Thus, to achieve good specificity, experimental conditions must be changed to push the sensor to a concentration-limited regime, that is, a regime where the number of target molecules participating in DNA complexes is low relative to the total number of target molecules in the sample.

1.4. MILESTONES

The main milestones of the research work contained in this PhD Thesis are:

- The design and development of an amperometric magnetoimmunosensor for *S. pneumoniae* determination in human urine samples.
- The improvement of the sensitivity of the pneumococcal determination with an electrochemical magneto-immuno-PCR strategy.
- The use of a magnetoimmunosensor based on a competitive assay format for the determination of *Staphylococcal* prot A and *S. aureus* in milk.
- The design and development of different types of magnetoimmunosensors for the determination of several CBs of clinical relevance.
- The design and development of a dual magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of NT-proBNP and CRP in human serum samples.
- The implementation of a novel strategy for the immobilization of specific Abs on carbon surfaces applied to the development of an integrated immunosensor for Lp(a) determination in human serum.
- The study of the determinants of the limit of detection and the specificity of surface-based biosensors through the development of an integrated DNA electrochemical sensor model.

Several papers have been published as a result of the research work described in this PhD Thesis:

1. Campuzano, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Yuste, J.; Pedrero, M.; García, J. L.; García, P.; García, E.; Pingarrón, J. M. **“Disposable amperometric magnetoimmunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*”**. *Biosensors & Bioelectronics*, 2010, 26, 1225–1230.
2. Campuzano, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Pedrero, M.; García, J. L.; García, E.; García, P.; Pingarrón, J. M. **“Electrochemical magneto-immuno-PCR approach**

for direct and highly sensitive detection of *Streptococcus pneumoniae*". *Chemical Sensors*, 2011, 1, 1–8.

3. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Pedrero, M.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M. **"Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus*"**. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, 2012, 403, 917–925.
4. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. **"Disposable electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of troponin T cardiac marker"**. *Electroanalysis*, 2013, 25, 51–58.
5. Del Campo, F.; Abad, L.; Muñoz, F.; Fernández, L.; Calavia, D.; Colom, G.; Salvador, J.; Marco, M.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano-Ruiz, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M.; Godino, N.; Gorkin III, R.; Ducreé J. **"Design and fabrication of a COP-based microfluidic chip: chronoamperometric detection of troponin T"**. *Electrophoresis*, 2012, 33, 3187–3194.
6. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. **"Disposable amperometric magnetoimmunosensor for the sensitive detection of the cardiac biomarker amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in human serum"**. *Analytica Chimica Acta*, 2013, 784, 18–24.
7. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Watkins, H.; Pingarrón, J. M.; Plaxco, K.; Palleschi, G.; Ricci, F. **"Determinants of the detection limit and specificity of surface-based biosensors"**. *Analytical Chemistry*, 2013, 85, 6593–6597.
8. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; J. P. Salvador; M. P. Marco; Pingarrón, J. M. **"Ultrasensitive amperometric**

magnetoimmunosensor for human C-reactive protein quantification in serum".

Sensors & Actuators: B. Chemical, 2013, 188, 212–220.

9. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.; Lanzone, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Compagnone, D.; Pingarrón, J. M. **"Multiplexed determination of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide and C-reactive protein cardiac biomarkers in human serum at a disposable electrochemical magnetoimmunosensor"**. *Electroanalysis*, 2014, 26, 254–261.
10. Esteban-Fernández de Ávila, B.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Salvador, J-P.; Marco, M-P.; Pingarrón, J. M. **"Integrated amperometric immunosensor for lipoprotein (a) determination in human serum"**. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, Submitted.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO

Durante los últimos años, ha crecido el interés en el diseño y desarrollo de biosensores electroquímicos basados en diferentes arquitecturas de reconocimiento para abordar distintos problemas analíticos de relevancia en el campo de la salud pública, buscando la descentralización del proceso analítico. En estos diseños se ha generalizado el uso de anticuerpos (Ab) y oligonucleótidos que permiten una detección rápida y selectiva de analitos biológicos de importancia clínica.

El trabajo experimental que se presenta en esta Tesis Doctoral, realizado en los laboratorios del Grupo de Electroanálisis y (Bio)sensores Electroquímicos de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, se ha centrado en el **desarrollo de métodos fiables, sencillos y sensibles, basados en nuevos diseños de inmunosensores y genosensores para la detección y cuantificación de bacterias y marcadores de importancia clínica y alimentaria en muestras de interés**. Para ello, en general, se han utilizado como superficies de inmovilización partículas magnéticas funcionalizadas (MBs) y como superficies transductoras electrodos serigrafiados desechables de oro (SPAuEs) y de carbono (SPCEs).

Dicho objetivo queda recogido dentro de los previstos en los siguientes proyectos de investigación subvencionados:

- Bioplataformas electroanalíticas para multidetección: de electrodos duales serigrafiados a nanoarrays de bioelectrodos (CTQ2009-09351).
- Chip Architectures by Joint Associated Labs for European diagnostics (120215-CAJAL4EU).

Para conseguir el objetivo global especificado, el trabajo de investigación ha seguido un planteamiento metodológico por etapas, consistente en:

1) Desarrollo de nuevos diseños de biosensores para la detección y cuantificación de marcadores biológicos. En esta fase de la Tesis Doctoral se ha pretendido diseñar, optimizar, evaluar y comparar diferentes sensores en los que se han incluido anticuerpos o sondas de captura apropiadas para la obtención de

inmunosensores y genosensores capaces de detectar y cuantificar microorganismos patógenos y marcadores cardíacos. Para ello se ha optimizado cada una de las variables implicadas en los procesos de biosensorización y detección, con objeto de conseguir las mejores características analíticas, y se han estudiado sistemas de amplificación de la señal mediante el empleo de estrategias de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y formatos basados en nuevos conjugados de anticuerpos. Los trabajos de investigación realizados han sido los siguientes:

- **Inmunosensores específicos para bacterias y marcadores cardíacos.** Este bloque de trabajo ha englobado el desarrollo de diferentes estrategias basadas en el empleo de magnetosensores amperométricos y anticuerpos específicos que permitían una detección rápida, selectiva y sensible de las bacterias *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) y *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y de los marcadores cardíacos troponina T cardíaca (cTnT), péptido natriurético cerebral amino terminal (NT-proBNP), proteína C reactiva (CRP) y lipoproteína-a (Lp(a)).
- **Genosensores específicos para marcadores clínicos.** Este capítulo se ha dedicado al desarrollo de una metodología inmuno-PCR, basada en el empleo de sondas de captura específicas, que supuso una mejora significativa en la sensibilidad del inmunosensor desarrollado previamente para *S. pneumoniae*, permitiendo su aplicación al análisis de muestras clínicas.

Con el fin de conseguir los objetivos mencionados, se siguió el siguiente esquema de plan de trabajo:

1. Obtención y selección de los elementos de reconocimiento específicos.
2. Selección del formato de inmunoensayo.
3. Optimización de las variables experimentales.
4. Estudio de las características analíticas y selectividad de los biosensores desarrollados.
5. Aplicación a la determinación de los analitos de interés en muestras reales inoculadas o enriquecidas y en materiales de referencia certificados.

2) Asimismo, se ha llevado a cabo el **desarrollo de nuevas plataformas bioelectroanalíticas de multidetección y cuantificación de marcadores cardiacos** para la evaluación rápida de muestras reales. Se ha realizado la integración de los principios y metodologías propias de los inmunosensores desarrollados previamente para detección individual en plataformas bioelectroanalíticas que permiten abordar con éxito la detección simultánea de analitos en un único ensayo, con el cumplimiento de los requerimientos necesarios de sensibilidad y minimización de interferencias cruzadas, para poder ser trasladadas de métodos de investigación a técnicas bien establecidas para futuras aplicaciones rutinarias. En esta línea, se ha trabajado en colaboración con varios grupos de investigación europeos (proyecto CAJAL4EU) en el desarrollo de una bioplataforma para multidetección de marcadores cardiacos.

Las características operacionales de todas las bioplataformas implementadas se han establecido y comparado con metodologías oficiales o ampliamente aceptadas para el problema planteado. Para ello se ha seguido el siguiente plan de trabajo:

- Selección de los biorreceptores más apropiados y del formato más favorable de ensayo.
- Diseño de nuevas plataformas con propiedades bioelectrónicas mejoradas.
- Optimización de las metodologías particulares para conseguir las características analíticas de funcionamiento de las (bio)plataformas que asegurasen el cumplimiento de los objetivos del proyecto.
- Estudio de la capacidad de multidetección de las plataformas multianalito desarrolladas. Evaluación de su respuesta frente a muestras reales enriquecidas con diferentes combinaciones/concentraciones de los analitos de interés.
- Evaluación y minimización de los falsos positivos.
- Validación de las (bio)plataformas que cumplan los requisitos establecidos y su implementación en un sistema de microfluídica.
- Integración de las (bio)plataformas en un instrumento portátil susceptible de ser transferido a empresas para su comercialización.

2.2. EMPLEO DE SENSORES EN EL ANÁLISIS CLÍNICO

Definición

Un **sensor** se define como un dispositivo que proporciona información del estado biológico, físico o químico de un sistema. Este dispositivo debe estar adaptado para operar en el medio en el que se va a medir la característica del sistema y, preferiblemente, su señal se debe poder detectar de forma remota. Concretando un poco más, de acuerdo con la definición de la IUPAC, "un sensor químico es un dispositivo integrado formado por un elemento de reconocimiento o receptor, que está en contacto directo con un elemento de transducción, lo que permite transformar una información química específica en una señal analítica útil" [Hulanicki, 1991].

El aumento del interés en el desarrollo de sensores aplicables al análisis clínico, radica en las ventajas que ofrecen para dar respuesta a las siguientes demandas:

- Necesidad de medidas en tiempo real y en lugares de difícil acceso.
- Simplificación de los procesos de análisis y aumento de su eficiencia.
- Creación de dispositivos miniaturizados.
- Necesidad de detección simultánea de diferentes analitos.
- Necesidad de herramientas analíticas rentables.

Por estos motivos, el desarrollo de sensores químicos ha sido un importante objeto de investigación de varias áreas de conocimiento analítico, entre las que destacan el análisis medioambiental, el diagnóstico médico o el control de calidad en la industria alimentaria, surgiendo a finales del siglo XX como una poderosa alternativa a las técnicas analíticas convencionales [Baeumner, 2003].

El receptor de un sensor químico debe ser capaz de interactuar con las moléculas del analito, catalizar una reacción selectivamente o participar de un equilibrio químico. Idealmente, esta interacción debe ser de elevada afinidad y especificidad, buen rango dinámico, rápida respuesta en el tiempo y relativa estabilidad. Cualquier entidad química o biológica capaz de establecer interacción con

el analito puede ser un receptor, como por ejemplo pequeñas moléculas orgánicas, péptidos, proteínas, ácido desoxiribonucleico (DNA) o incluso células vivas.

Atendiendo a los criterios anteriormente mencionados, un **biosensor** se define como aquel sensor químico que, a través de reacciones bioquímicas específicas, aprovecha las propiedades de los mecanismos biológicos y las utiliza como sistemas de reconocimiento para la detección de compuestos químicos [Thevenot, 2001]. La especificidad del receptor y la sensibilidad del transductor confieren a los biosensores unas propiedades analíticas únicas [Kissinger, 2005].

Clasificación

Los biosensores pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios. Por ejemplo, **en función del tipo de ensayo** empleado, se distingue entre [van der Voort, 2005]:

- Biosensores directos, en los que la reacción se determina directamente midiendo los cambios físicos producidos como consecuencia de la formación del enlace entre el analito y el elemento de biorreconocimiento.
- Biosensores indirectos, en los que para poder detectar la unión del analito y el receptor debe producirse una reacción adicional. En este tipo de ensayo se emplean reactivos marcados, de cuya naturaleza depende la detección, y que pueden ser de varios tipos: enzimáticos (peroxidasa, glucosa-oxidasa, fosfatasa alcalina, catalasa o luciferasa) compuestos electroactivos (ferroceno, sales de In^{2+}) y marcadores fluorescentes. Dentro de este grupo se distinguen a su vez dos tipos de formato:
 - **Formato de tipo competitivo**, en el que el analito de la muestra compite con un analito marcado por unos determinados sitios de anclaje a un biorreceptor específico. La medida es inversamente proporcional a la concentración, ya que según aumente la concentración de analito de la muestra, mayor cantidad de analito marcado será desplazado, lo que producirá una disminución en la señal analítica [Jiang, 2008].

- Por el contrario, en los **formatos no competitivos** la señal es directamente proporcional a la concentración de analito. El formato más común es el de tipo sándwich, que consta de dos pasos de reconocimiento: en un primer paso el elemento de biorreconocimiento se inmoviliza en una superficie transductora permitiendo la captura del analito y, en un segundo paso, tras la adición del antígeno (Ag), se añade un biorreceptor marcado para completar el complejo. En general, este formato proporciona una mayor sensibilidad y selectividad.

Asimismo, los biosensores pueden clasificarse **según la naturaleza física del transductor**, pudiéndose agrupar en sensores piezoeléctricos, termométricos, magnéticos, ópticos y electroquímicos [Lazcka, 2007], [Janata, 2009]. Estos últimos, que engloban los sensores potenciométricos, conductimétricos y amperométricos, son los más utilizados para la monitorización de especies de interés clínico.

Las **técnicas electroquímicas**, basadas en la detección de la transferencia de electrones causada por la interacción receptor-analito, ofrecen varias ventajas, entre las que destacan su sencillez, elevada sensibilidad, fácil manejo, bajo coste de la instrumentación requerida y facilidad de miniaturización [Ronkainen-Matsuno, 2002]. En contraposición, cabría citar la necesidad de emplear un electrodo de referencia que mantenga una diferencia de potencial constante del potencial respecto al electrodo de trabajo durante el transcurso de la medida electroquímica; y por otro lado la baja selectividad de las técnicas electroquímicas en comparación con otras técnicas analíticas, inconveniente que se minimiza al emplear un sistema de reconocimiento biológico con gran selectividad para los analitos de estudio.

Dentro de los biosensores electroquímicos, los de mayor interés son los **biosensores amperométricos**, que monitorizan las corrientes faradaicas resultantes del intercambio electrónico entre el sistema de reconocimiento biológico y un electrodo mantenido a un potencial constante apropiado. La intensidad de corriente (i_d) generada cuando una determinada especie electroactiva se oxida o se reduce, se relaciona directamente con la concentración de dicha especie a través de la siguiente expresión:

$$i_d = n d C_s = k C_s$$

donde n es el número de electrones totales intercambiados en la reacción electroquímica, d viene definida por el producto entre la constante de Faraday, el área del electrodo y la constante de velocidad de transferencia de masa, C_s es la concentración de analito en disolución y k el coeficiente de proporcionalidad entre i_d y C_s , que toma diferentes valores según el tipo de electrodo empleado.

Generalmente, la detección amperométrica de la biorreacción precisa de la utilización de marcadores que fundamentalmente son enzimas oxidorreductasas. La detección de la reacción entre el biorreceptor y el antígeno puede llevarse a cabo mediante la medición amperométrica del producto o del sustrato de la reacción enzimática, siempre que estos compuestos sean electroactivos, aunque en este tipo de sistemas es frecuente la aparición de interferencias por otras moléculas electroactivas presentes en la muestra analizada. Estos problemas se pueden evitar buscando sustratos o productos de la reacción enzimática con potenciales alejados de los interferentes, o bien, recurriendo a otras estrategias, como la medida amperométrica del intercambio de electrones que tiene lugar entre el centro activo de la enzima y la superficie del electrodo. Este intercambio de electrones puede darse de manera directa, si la orientación del centro activo de la enzima y su distancia al electrodo es la adecuada, o bien, mediante la utilización de un intercambiador de electrones no fisiológico, denominado mediador. Estos mediadores son generalmente moléculas de bajo peso molecular, capaces de transferir electrones entre el centro activo de la enzima y el electrodo. El mediador puede ser utilizado en disolución, ser adsorbido en la superficie del electrodo, atrapado junto a la enzima en un polímero conductor sobre la superficie electródica, unido covalentemente o mezclado en una pasta de carbono.

La elevada sensibilidad y la rápida respuesta suponen las principales ventajas de las técnicas amperométricas como transductores. Es por ello que el desarrollo de biosensores amperométricos se ha aplicado en diversos campos de estudio, entre los que destacan la determinación de bacterias [Escamilla-Gómez, 2008^a], [Song, 2012],

de marcadores de enfermedades [Rusling, 2009], y de contaminantes ambientales [Fähnrich, 2003], [Mulchandani, 2005], entre otros.

Junto con los biosensores amperométricos, los voltamperométricos, que emplean técnicas de medida como la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) y la de onda cuadrada (SWV), proporcionan elevados niveles de sensibilidad.

Los biosensores también se pueden clasificar en función de **la naturaleza del elemento biológico de reconocimiento**, en biosensores catalíticos, basados en el empleo de enzimas, tejidos y microorganismos; y biosensores de afinidad, entre los que se encuentran los inmunosensores, genosensores y aptasensores [D’Orazio, 2003].

- Los **biosensores catalíticos** más utilizados son los enzimáticos, basados en el empleo de proteínas que catalizan reacciones enzimáticas que son muy eficientes y extremadamente selectivas. En dichas reacciones, la molécula transformada se denomina sustrato y normalmente implica el uso de otro reactivo llamado cofactor, para generar los correspondientes productos. Dentro de los grupos de enzimas, las más importantes para fines analíticos son las oxidoreductasas, las hidrolasas y algunas liasas. El carácter catalítico hace que en su reacción con el sustrato se regeneren a su estado inicial y no sea necesario ningún tipo de tratamiento para restablecer el biosensor. Esta característica hace que sea posible una monitorización continua y reversible, lo que no siempre ocurre con otro tipo de material biológico, como es el caso de los anticuerpos.
- En cuanto a los **biosensores de afinidad**, el biomaterial que se inmoviliza sobre la superficie transductora suele ser un anticuerpo o un fragmento de DNA, siendo los materiales electródicos más empleados el platino, oro, carbono vitrificado, pasta de carbono y electrodos serigrafiados (SPEs).

Estrategias de inmovilización

Uno de los aspectos más importantes en la fabricación de un biosensor electroquímico es la elección del **método de inmovilización** de las distintas biomoléculas en la superficie del electodo; la técnica de inmovilización debe permitir un íntimo contacto entre el biorreceptor y el transductor, manteniendo inalterable en la medida de lo posible, la estabilidad y actividad biológica de las biomoléculas [Tedeschi, 2003]. Otro objetivo fundamental es asegurar la orientación controlada de la biomolécula sobre la superficie electródica. Los métodos de inmovilización pueden ser métodos físicos, fundamentalmente por adsorción o por atrapamiento, o métodos químicos, ya sea mediante unión covalente o por entrecruzamiento ("cross-linking") o por uniones de afinidad. Dentro de cada método existen numerosas variantes y, además, es posible utilizar combinaciones entre ellos [Pingarrón, 1999].

- La **inmovilización por adsorción** es el método más sencillo, y consiste en poner en contacto las biomoléculas, bien mediante incubación en una disolución o por deposición de una gota, en un material adsorbente durante un tiempo suficiente para que se produzcan interacciones de tipo no covalente (fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas, enlaces de hidrógeno o de Van der Waals) entre los lugares activos del material adsorbente y las moléculas biológicas. Los principales inconvenientes de este método son, la aleatoriedad de la inmovilización con respecto a los grupos funcionales implicados en la biorreacción, y la reversibilidad de la adsorción de la proteína sobre la superficie, pudiéndose provocar la desorción de la biomolécula por cambios de pH, de fuerza iónica de la disolución o de temperatura.

En los últimos años se ha extendido el empleo de **nanopartículas**, principalmente metálicas y de óxidos, como modificadores electródicos capaces de mejorar las propiedades de adsorción. Se ha demostrado que anticuerpos, antígenos y enzimas retienen su actividad cuando se inmovilizan sobre superficies modificadas con nanopartículas, ya que éstas proporcionan un ambiente similar a su entorno natural. Muchas de las configuraciones descritas utilizan nanopartículas de oro (AuNPs), que proporcionan un notable aumento de la superficie activa del electrodo donde inmovilizar el material biológico [Baptista, 2008]. Por ejemplo, en el trabajo de Ou y

col. [Ou, 2007] desarrollaron un inmunosensor amperométrico para la detección del antígeno carcinoembrionario (CEA), un importante marcador de varios tipos de cáncer. El empleo de AuNPs contribuyó a la mejora de la sensibilidad del sensor, alcanzando un límite de detección (LD) de 0.01 ng mL^{-1} , y mostrando unas características de reproducibilidad y estabilidad muy buenas. El grupo de Yang y col. [Yang, 2009^a], desarrollaron otro inmunosensor basado en el empleo de AuNPs para la detección de la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG). La metodología consistió en inmovilizar un anti-hCG sobre una película de AuNPs y quitosano depositada sobre un electrodo de carbono vitrificado, estableciéndose un esquema de tipo sándwich con anti-hCG marcado con peroxidasa de rábano (anti-hcG-HRP), que permitió alcanzar un LD de 0.1 mIU mL^{-1} . El fuerte efecto electrocatalítico existente permitió la aplicación de un potencial de detección del H_2O_2 de -0.11 V sin necesidad de mediador.

Por otro lado, otros materiales que poseen unas propiedades muy favorables para la preparación de biosensores electroquímicos son los **nanotubos de carbono** (CNTs), que proporcionan una alta conductividad, elevada área superficial y fuerte capacidad de adsorción [Lin, 2004]. En sus aplicaciones se utilizan estrategias basadas en la modificación covalente o no covalente de este material, así como en la preparación de híbridos con polímeros u otros nanomateriales. Un ejemplo de aplicación de este material queda reflejado en el trabajo desarrollado por Sun y col. [Sun, 2012] que emplearon un electrodo de carbono vitrificado modificado con nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs), tionina y quitosano, para desarrollar un inmunosensor amperométrico para la detección de clorpirifós, un insecticida moderadamente tóxico cuya exposición crónica se ha relacionado con efectos neurológicos, trastornos del desarrollo y autoinmunes. La modificación del electrodo con los tres componentes citados proporcionaba una elevada estabilidad, facilitando la posterior inmovilización del anticuerpo monoclonal selectivo para clorpirifós, y mejorando así la sensibilidad del inmunosensor.

Recientemente han comenzado a desarrollarse inmunosensores basados en **grafeno** para aplicaciones clínicas. Como es conocido, el grafeno consiste en una única lámina de átomos de carbono unidos en una red hexagonal, y posee excepcionales

propiedades electrónicas y térmicas [Zhong, 2010]. Un ejemplo de aplicación de este material para la fabricación de biosensores electroquímicos es el del trabajo desarrollado por Du y col. [Du, 2010], que desarrollaron un inmunosensor de tipo sándwich para marcadores tumorales, ofreciendo una interesante estrategia de amplificación, y una alternativa muy atractiva para el diagnóstico clínico in situ de dichos biomarcadores.

- La **inmovilización por atrapamiento** puede realizarse por inclusión dentro de una matriz polimérica o en la propia matriz transductora o por encapsulamiento de la biomolécula dentro de una membrana semipermeable. Con este tipo de inmovilización se observa una disminución en la velocidad de la reacción enzimática, y por tanto, de la señal analítica, debido a que los analitos tienen que difundir a través de la membrana o de la película. Además, al ser las membranas semipermeables, estos dispositivos suelen ser selectivos, permitiendo el paso de ciertas moléculas, las de interés, pero no de algunas especies interferentes [Pingarrón, 1999]. En este tipo de inmovilización, aunque tampoco existen interacciones químicas entre el soporte y la biomolécula, sí puede evitarse la desorción del componente biológico. Entre los materiales utilizados para la retención de enzimas destacan membranas de acetato o nitrato de celulosa, poli-vinilalcohol, nafión, poliuretanos, policarbonato, membranas de diálisis y matrices poliméricas derivadas del metacrilato [Darder, 2000].

- Dentro de los métodos de inmovilización química, destaca la inmovilización por **enlace covalente**, debido a la estabilidad que proporciona el enlace formado, lo que aporta importantes ventajas en la inmovilización del material biológico [Ferretti, 2000] como, por ejemplo, la posibilidad de conseguir un alto grado de recubrimiento uniforme, la reducción de posibles orientaciones aleatorias que pueda adoptar la proteína en la superficie del electrodo y el riesgo mínimo de pérdida de material biológico. Como principal desventaja de la unión covalente, cabe citar la disminución de la capacidad específica de enlace de las biomoléculas. La principal razón de este problema se debe a la orientación al azar de las biomoléculas y a la multiplicidad de posiciones de unión de la proteína con el soporte, lo cual impide el acceso al sitio activo (en el caso de las enzimas) o a la zona de reconocimiento antigénico (en el caso

de los anticuerpos) [Yuanyuan, 2006]. Por ejemplo, en la preparación de inmunosensores se ha observado que la unión covalente de los anticuerpos al soporte mediante el empleo de succinimida, carbodiimida, iodato o glutaraldehído, produce una pérdida de bioactividad, debido a que los puntos de unión pueden situarse más o menos cerca de los parátomos, lo que hace que, en ocasiones, la orientación espacial del anticuerpo inmovilizado impida la formación del inmunocomplejo [Lu, 1996].

Una estrategia sencilla, versátil y reproducible para desarrollar sistemas con un alto nivel de organización molecular es la formación de **monocapas autoensambladas** (SAMs). La fabricación de SAMs de tioles constituye una metodología muy adecuada para la inmovilización de anticuerpos o antígenos, ya que dichas configuraciones se caracterizan por presentar una menor adsorción inespecífica y permitir un mejor control de la orientación de los anticuerpos, lo que se consigue introduciendo ligandos complementarios a los sitios enlazantes de las proteínas. Uno de los procedimientos empleados en algunos de los trabajos presentados en esta Tesis Doctoral, ha sido el de enlazar covalentemente anticuerpos a SAMs, mediante la reacción del sistema de la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y la N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS) [Lahiri, 1999], en la que la EDC convierte el ácido carboxílico en un reactivo intermedio susceptible de ser atacado por aminas, con la consiguiente formación de un enlace amida de elevada estabilidad (**Figura 1**). La incorporación de la sulfo-NHS da lugar a un reactivo intermedio más estable que favorece la reacción de inmovilización [Wang, 2006].

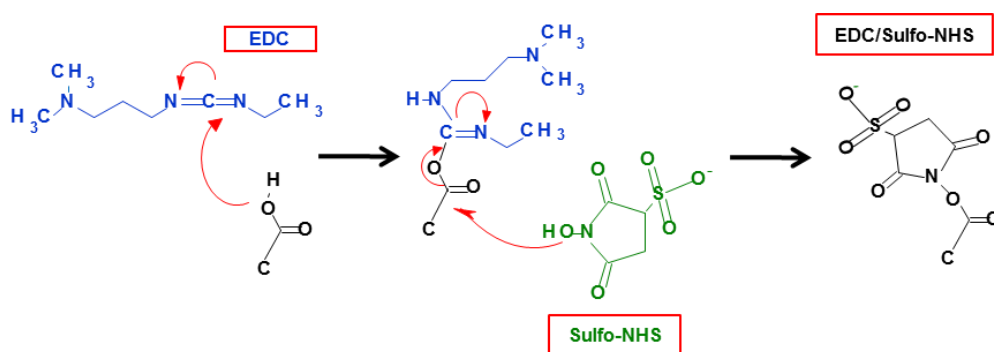


Figura 1. Esquema de reacción del sistema formado por la N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) y la N-hidroxisulfosuccinimida (Sulfo-NHS).

Un ejemplo de aplicación de este sistema es el trabajo desarrollado por Viswanathan y col. [Viswanathan, 2012], que consistía en un inmunosensor electroquímico para la detección del marcador de cáncer de ovario MUC16 en suero humano. En el desarrollo de este inmunosensor se empleó un nanoelectrodo de oro modificado con una SAM de cisteamina sobre la que se inmoviliza el anticuerpo de captura mediante el sistema EDC/sulfo-NHS y, por otro lado, liposomas encapsulados modificados con ferroceno y grupos carboxílicos sobre los que se inmovilizó el anti-MUC16. Se llevó a cabo un inmunoensayo tipo sándwich entre el nanoelectrodo de oro funcionalizado con el anti-MUC16, el antígeno y los inmunoliposomas y tras liberar el ferroceno de los mismos se procedió a su detección electroquímica mediante DPV aplicando un barrido de potencial entre -0.3 y 0.5 V, alcanzando un LD de 5×10^{-4} U mL⁻¹.

- Por otro lado cabe destacar la unión por **entrecruzamiento** o “cross-linking”, método basado en el entrecruzamiento intramolecular entre las biomoléculas y polímeros con grupos bi- o multifuncionales, y que puede llevarse a cabo por copolimerización con otra proteína inerte (albúmina o gelatina) o por adsorción de las biomoléculas sobre un adsorbente, realizándose después el entrecruzamiento. Uno de los agentes bifuncionales más empleados en el entrecruzamiento es el glutaraldehído. Dicha reacción se basa en la adición nucleófila o condensación de aminas con los grupos carbonilo de aldehídos y cetonas, resultando un hemiaminal, que pierde agua para formar un doble enlace carbono-nitrógeno, denominado imina o base de Schiff [Vollhardt, 1992]. La reacción entre el glutaraldehído y los grupos amino de la enzima origina una matriz insoluble que da lugar a multicapas de enzima en la superficie electródica [Gooding, 1999] y permite la retención de una gran cantidad de biomolécula sobre el electrodo modificado. La formación irreversible de dobles enlaces debido a la polimerización del glutaraldehído mediante reacciones de aldolización [Richards, 1968] también contribuye a la obtención de la matriz insoluble.

Este método ha sido ampliamente utilizado en la estabilización de muchas enzimas; presenta grandes ventajas como son la rapidez y sencillez del proceso así como la estabilidad de la actividad de la molécula inmovilizada; además, la reacción de

entrecruzamiento es rápida, aparentemente irreversible y no provoca cambios en la estructura cristalina de una gran variedad de proteínas, ventajas que contribuyen al mantenimiento de la estabilidad del biosensor [Li, 2008].

- El procedimiento de inmovilización mediante **unión por afinidad** supone también una excelente estrategia para conseguir una óptima orientación de los biomateriales, especialmente de los anticuerpos en la fabricación de inmunosensores. Dentro de este tipo de inmovilización, se ha estudiado la interacción de elementos de biorreconocimiento y antígenos con distintas proteínas:

- La **proteína A** (ProtA) es un polipéptido de 42 kDa que forma parte de la pared celular del *S. aureus*. Su interacción con los anticuerpos se ha estudiado con gran detalle; tiene cuatro lugares potenciales de unión a los mismos y es bifuncional, permitiendo la formación de complejos multiméricos con las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada del anticuerpo. La unión implica la formación de un conjunto de enlaces no covalentes entre los aminoácidos del fragmento cristalizable (región Fc) y la proteína A, que aunque de manera individual son débiles, en conjunto tienen una energía de unión que equivale o supera a un enlace de naturaleza covalente. Por otro lado, la unión de los anticuerpos a estas proteínas bacterianas a través de la región Fc permite dejar libres los sitios de unión al Ag, eliminándose así los inconvenientes de la orientación al azar de los anticuerpos sobre los soportes sólidos. La afinidad de la proteína A depende de las regiones Fc del anticuerpo, siendo más elevada para los anticuerpos humanos, de burro, conejo, perro, cerdo y cobaya. Es una proteína muy útil en estudios inmunocitoquímicos por diversas razones: la unión del anticuerpo a la proteína A no cambia la capacidad de unión al antígeno (ya que la región de unión con el anticuerpo reside en la región Fc), una proteína A desnaturalizada se puede volver a renaturalizar fácil y rápidamente recuperando su capacidad de unión, y aunque la afinidad de la proteína A por el anticuerpo es elevada, la unión ProtA-anticuerpo se puede romper con facilidad reduciendo el pH.

- Otra proteína que también es capaz de unir la región Fc de los anticuerpos, es la **proteína G**, de peso molecular comprendido entre 30 y 35 kDa, y aislada de la pared celular del *Streptococcus beta-hemolítico* de las cepas G o C [Jung, 2007]. Ésta se diferencia de la proteína A en su capacidad de reconocimiento de anticuerpos, ya que la proteína G es capaz de reconocer las cuatro clases de IgG (incluyendo la IgG3), pero no tiene capacidad de unión para las IgM e IgA; además, la proteína G tiene el inconveniente de que posee un segundo lugar de unión a la albúmina [Zatta, 1996].
- Por otro lado, el sistema **biotina-(estrept)avidina** puede usarse fácilmente como puente para enlazar un reactivo (una enzima, un anticuerpo o una cadena de DNA) a una superficie recubierta de avidina o estreptavidina (Strp), presentando numerosas ventajas [Häussling, 1991]. La avidina es una glucoproteína tetramérica de 67 kDa, con regiones hidrofóbicas en su superficie a las que la biotina se une con gran afinidad, dando origen a una interacción no covalente casi irreversible [Cosnier, 1999]. La estreptavidina fue aislada de la bacteria *Streptomyces avidinii*, y también se trata de una proteína tetramérica (60 kDa) muy estable, y capaz de unir específicamente hasta cuatro moléculas de d-biotina. Por último, la biotina (biotin), conocida como vitamina H, es una proteína soluble en agua de peso molecular bajo (244 Da), que presenta un grupo carboxílico que permite su unión a los restos amino de las proteínas. La reacción bioquímica que permite unir biotina a una gran variedad de moléculas (enzimas, lectinas, anticuerpos, ácidos nucleicos...) se denomina biotinización, proceso que no afecta a la actividad biológica de la biomolécula [Tombelli, 2000]. Dicho complejo no covalente se caracteriza por una constante de afinidad extraordinariamente alta (10^3 veces más fuerte que la interacción normal entre un anticuerpo y su antígeno [Storri, 1998]) y una constante de disociación excepcionalmente baja ($k_d = 10^{-15} \text{ mol}^{-1} \text{ L}$) [Chilkoti, 1995], lo que hace que sea un enlace muy estable en condiciones extremas. Como ejemplo del empleo del sistema biotina-(estrept)avidina en el campo de los biosensores, cabe citar un trabajo desarrollado en nuestro grupo de investigación basado en la preparación de un inmunosensor integrado para la determinación de

estradiol [Ojeda, 2012]. La metodología se basaba en la modificación de la superficie de SPCEs con ácido *p*-aminobenzoico, seguida de la unión covalente de la Strp y posterior inmovilización de un anti-estradiol biotinilado. La determinación de la hormona se llevó a cabo mediante un formato de inmunoensayo competitivo directo con estradiol-HRP, registrando la señal amperométrica a -0.2 V mediante el empleo de hidroquinona (HQ) como mediador redox, alcanzando un LD de 0.77 pg mL⁻¹. La aplicabilidad del inmunosensor se demostró mediante el análisis de un suero humano certificado y de muestras de orina enriquecidas.

Magnetobiosensores

En el campo de los biosensores, durante los últimos años se ha producido un gran impulso en el empleo de **partículas magnéticas** (MBs) como plataformas de bioinmovilización, transportadores biomoleculares, separadores y concentradores de diversos analitos, así como para controlar procesos electroquímicos que sucedan en las superficies electródicas [Stanciu, 2009]. Las MBs están constituidas por distintos materiales (microesferas, nanoesferas y ferrofluídos) en los que cada campo magnético de origen atómico es producido por un dipolo o un momento magnético, quedando todos ellos perfectamente orientados y unidos por una fuerza cohesiva [Sánchez, 2005]. Se trata de materiales altamente reactivos de relativamente bajo volumen, que constituyen una herramienta versátil en el desarrollo de biosensores, ya que proporcionan un gran área superficial para la unión de diversos elementos de reconocimiento y analitos específicos, que posteriormente pueden separarse fácilmente de la fase líquida mediante un imán, y dispersarse de forma inmediata al alejarlo. Además de acelerar significativamente las cinéticas de los procesos de reconocimiento, los reactivos que no se enlacen específicamente pueden eliminarse mediante un lavado controlado magnéticamente, lo que les da utilidad en procesos de purificación y preconcentración [Erdem, 2005], [Wang, 2001]. El empleo de MBs facilita enormemente las etapas de preparación de los biosensores y la detección [Centi, 2007], lográndose diseños que, generalmente, presentan mejores LDs y menores efectos matriz que las configuraciones convencionales equivalentes [Zacco, 2007].

Actualmente se dispone de distintos tipos de MBs comerciales, modificadas con diversos ligandos, como oligonucleótidos, estreptavidina y otras proteínas, además de grupos de reconocimiento de gran especificidad, como anticuerpos, para aplicaciones específicas en reacciones de bioafinidad [Paleček, 2007]. Por ejemplo, se dispone de micropartículas magnéticas modificadas con Strp para interaccionar con moléculas biotiniladas, otras carboxiladas y tosiladas, para inmovilización covalente, o con proteína A o proteína G, para la inmovilización orientada de anticuerpos (**Figura 2**). Gracias a las posibilidades que ofrecen, las MBs se han integrado perfectamente en el diseño de genosensores, inmunosensores, sensores enzimáticos y otros sensores de afinidad. En la **Tabla 1** se resumen algunos ejemplos de aplicación de MBs en el desarrollo de biosensores electroquímicos.

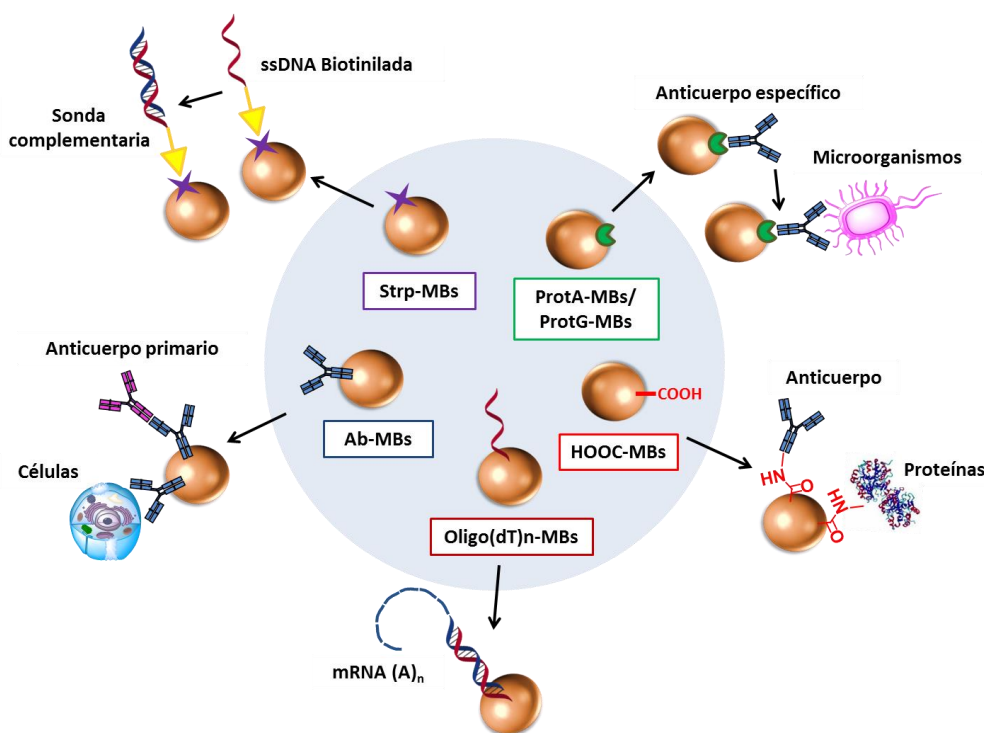


Figura 2. Ejemplos de partículas magnéticas (MBs) modificadas con diferentes elementos de reconocimiento para diversas aplicaciones.

Tabla 1. Biosensores basados en el empleo de partículas magnéticas (MBs).

Material electródico	Tipo de MBs	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de ensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
Electrodos pirolíticos de grafito	Oligo(dT) ₂₅ - MBs	Hibridación específica	Sondas de oligo(dT) ₂₅	–	–	Os bpy	CSV	–	[Paleček, 2002]
SPCE	Strp-MBs	Hibridación específica	DNA mutante	–	Directo		SWV/ASV	LD: 21.5 amol	[Liu, 2007]
m-GEC	Tosilo-MBs	Covalente	Sulfapiridina	Leche	Competitivo directo	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.15$ V H_2O_2 -HQ	IL: 4.2 – 175 $\mu g L^{-1}$ LD: 1.44 $\mu g L^{-1}$ $EC_{50} = 25.5 \mu g L^{-1}$	[Zacco, 2007]
ITO modificado con ferroceno	Tosilo-MBs	Covalente	IgG de ratón	–	Sándwich	AuNPs	DPV p-nitrofenol- NaBH ₄	LD: 100 ag mL ⁻¹	[Selvaraju, 2008]
SPCE	Oligo(dT)- MBs	Hibridación específica	mRNA	–	–	AP	SWV	IL: 1.35 – 216 pM LD: 0.68 pM	[Mao, 2008]
PGE modificado con AuNPs	HOOC-MBs	Covalente	PSA	Suero humano	Sándwich	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.2$ V H_2O_2 -HQ	IL: 1 – 10 pg mL ⁻¹ LD: 0.5 pg mL ⁻¹	[Mani, 2009]
SPCE	Tosilo-MBs	Covalente	Dioxinivalenol	Cereales	Competitivo indirecto	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.1$ V H_2O_2 -TMB	IL: 100 – 4500 ng mL ⁻¹ LD: 63 ng mL ⁻¹ $EC_{50} = 380$ ng mL ⁻¹	[Romanazzo, 2010]
SPCE	ProtA-MBs	Afinidad específica por la región Fc del Ab	Testosterona	Suero humano	Competitivo directo	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.2$ V H_2O_2 -HQ	IL: 5×10^{-3} – 50 ng mL ⁻¹ LD: 1.7 pg mL ⁻¹ $EC_{50} = 0.25$ ng mL ⁻¹	[Eguílaz, 2010]
SPAuE modificado con TTF	ProtA-MBs Strp-MBs	Afinidad específica por la región Fc del Ab e hibridación con secuencia de DNA complementaria	<i>S. pneumoniae</i> Cepa Dawn y R6	–	Sándwich	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.15$ V H_2O_2 -TTF	IL: 1.0×10^2 – 1.0×10^4 cfu mL ⁻¹ (Dawn y R6) LD: 130 cfu mL ⁻¹ (Dawn) y 132 cfu mL ⁻¹ (R6)	[Campuzano, 2011]

Tabla 1. Biosensores basados en el empleo de partículas magnéticas (MBs) (Continuación).

Material electródico	Tipo de MBs	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de ensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
SPCE	ProtG-MBs	Afinidad específica por la región Fc del Ab	Tetraciclinas	Leche	Competitivo directo	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.2V$ H_2O_2 -HQ	IL: 12.5 – 676.2 ng mL ⁻¹ LD: 3.9 ng mL ⁻¹ EC ₅₀ : 91.8 ng mL ⁻¹	[Conzuelo, 2012]
SPCE	ProtG-MBs	Afinidad específica por la región Fc del Ab	Hongo de mycelium	–	Sándwich	AP	DPV naftilfosfato	LD: 18 ng mL ⁻¹	[Mendes, 2012]
Electrodo de platino	Tosilo-MBs	Covalente	<i>E. coli</i> O157:H7	Cultivos de bacterias	Sándwich	–	EIS 50mVpp 1-10 Hz	LD: 10 cfu mL ⁻¹	[Chan, 2013]

Abreviaturas utilizadas: **Ab:** anticuerpo; **AP:** fosfatasa alcalina; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **cfu:** unidades formadoras de colonias; **CSV:** voltamperometría de redisolución catódica; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **EC₅₀:** concentración que da lugar al 50 % de inhibición respecto del valor máximo; **E. coli:** *Echerichia coli*; **EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica; **Fc:** región constante del anticuerpo; **HQ:** hidroquinona; **HRP:** peroxidasa de rábano; **IgG:** inmunoglobulina G; **IL:** intervalo lineal; **ITO:** óxido de indio y estaño; **LD:** límite de detección; **MBs:** partículas magnéticas; **m-GEC:** magnetocompuesto grafito-epoxi; **mRNA:** ácido ribonucleico mensajero; **Osbp:** complejo de Os-bipiridilo; **PGE:** electrodo de grafito pirolítico; **ProtA:** proteína A; **ProtG:** proteína G; **PSA:** antígeno específico de la próstata; **SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono; **SPAUE:** electrodo serigrafiado con pasta de oro; **S. pneumoniae:** *Streptococcus pneumoniae*; **Strp:** estreptavidina; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **TMB:** 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina; **TTF:** tetratífulvaleno.

Como puede observarse en la tabla, el empleo de MBs en biosensores permite desarrollar una gran variedad de metodologías adecuadas para la determinación de diferentes analitos de interés. En la mayoría de los ejemplos reflejados en la tabla se utilizan SPEs, ya que al ser planos, facilitan mucho la inmovilización de las MBs sobre su superficie con la ayuda de un imán.

Por ejemplo, Liu y col. [Liu, 2007], desarrollaron una metodología basada en Strp-MBs y sondas de captura con nanopartículas metálicas para detectar polimorfismos sencillos (SNPs) en secuencias de DNA, y poder discriminar entre ellos y fragmentos de DNA complementarios, alcanzando un LD de 21.5 amol. La detección se llevó a cabo empleando SPCEs, y la técnica electroquímica empleada fue la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) con redisolución por voltamperometría de onda cuadrada (SWV), siendo proporcional la señal electroquímica a la concentración de DNA en disolución.

Otras estrategias se han basado en conjugar MBs con partículas metálicas para mejorar la sensibilidad del método; es el caso del trabajo desarrollado por Selvaraju y col. [Selvaraju, 2008], que desarrollaron un inmunosensor electroquímico basado en el acoplamiento de MBs y AuNPs, estrategia que auna las ventajas de las MBs, como son la facilidad de separación magnética y el favorecimiento de la inmunoreacción, junto con la amplificación de la señal debida a las AuNPs.

La inmovilización covalente de las biomoléculas en la superficie de las MBs también permite lograr configuraciones de elevada sensibilidad. Por ejemplo, Mani y col. [Mani, 2009] desarrollaron un inmunosensor para la detección amplificada del antígeno específico de la próstata (PSA), un importante marcador del cáncer de próstata. Para su preparación se empleó un bioconjugado preparado por unión covalente de anti-PSA y HRP sobre la superficie de micropartículas modificadas con grupos carboxílicos, empleando EDC. Gracias a la gran cantidad de marcador enzimático inmovilizada sobre la superficie de las micropartículas y a la mayor eficiencia de los procesos de biorreconocimiento que se da en suspensiones de MBs agitadas, se pudo alcanzar un LD de 0.5 pg mL^{-1} en muestras de suero humano.

Las MBs modificadas con ProtA han demostrado también su utilidad en varias aplicaciones recientes, entre las que se puede destacar un trabajo de nuestro grupo de investigación en el que se ha desarrollado un inmunosensor de tipo competitivo directo para la determinación de testosterona en muestras de suero, consiguiéndose un LD de 1.7 pg mL^{-1} , veinte veces inferior a los obtenidos con otros inmunosensores descritos en la bibliografía [Eguílaz, 2010]. Por otro lado, los formatos basados en MBs modificadas con ProtG también se han empleado en multitud de trabajos; por ejemplo en el desarrollo un inmunosensor para la determinación de antibióticos en leche [Conzuelo, 2012], lo que constituye una metodología alternativa muy interesante para el análisis *in situ* de la calidad de muestras de leche de consumo humano.

Las MBs también han encontrado aplicación en la determinación de microorganismos patógenos; por ejemplo, Chan y col. [Chan, 2013] las han empleado para poner a punto un inmunosensor electroquímico de tipo sándwich capaz de determinar 10 cfu mL^{-1} de una de las cepas bacterianas más frecuentemente implicada en procesos de intoxicación alimentaria, la *E.coli* O157:H7.

Se han descrito otros formatos de magnetoinmunosensores atrapando las MBs modificadas sobre de una matriz compósita que contenía un imán en su interior. Como ejemplo puede destacarse el diseño de un inmunosensor basado en un electrodo compósito de grafito-epoxi para la determinación de antibióticos sulfonamida en leche, empleando MBs tosiladas para la inmovilización covalente del anticuerpo y HRP como marcador enzimático [Zacco, 2007].

Por otro lado, cabe destacar la importancia que han adquirido las MBs en el desarrollo de biosensores para detectar y cuantificar DNA. Mao y col. [Mao, 2008] aprovecharon las características de las MBs para desarrollar un método de cuantificación de mRNA sin necesidad de purificación del ácido ribonucleico (RNA) o de amplificación de la sonda diana, alcanzando un LD de 0.68 pM .

Como ha quedado reflejado, mediante el empleo de biosensores magnéticos se consigue aunar la gran selectividad y especificidad de los procesos biológicos con la

elevada área y las ventajosas propiedades magnéticas de las MBs para mejorar el control y la orientación de los elementos de reconocimiento biomolecular sobre las superficies transductoras, la selectividad, sensibilidad y estabilidad de los biosensores y reducir el tiempo de respuesta. Por todo ello, el interés por la aplicación de las MBs en los campos de la biología, biotecnología y medicina está en continuo crecimiento [Brückl, 2005].

Biosensores desechables

En la fabricación de biosensores, resulta muy interesante el desarrollo de **sensores desechables**, en los que la tecnología de serigrafiado (screen-printing) tiene un papel muy importante, ya que desde los años 1990 ha permitido, mediante la producción de SPEs, el desarrollo en masa de sensores desechables muy reproducibles y de bajo coste [Li, 2012]. Los SPEs son dispositivos producidos por impresión de diferentes tintas, de las que dependerá la selectividad y sensibilidad del análisis, en varios tipos de sustratos plásticos o cerámicos. Presentan una gran versatilidad, ya que el electrodo puede modificarse de muchas formas, bien alterando la composición de las tintas de impresión (adicionando metales, enzimas, polímeros, secuencias de DNA, agentes complejantes...) o depositando diversas sustancias en la superficie del electrodo (películas metálicas, enzimas, polímeros...) [Bobrowski, 2014].

Los biosensores desechables presentan varias ventajas, entre las que destacan la de no sufrir contaminación permanente y, además, evitar problemas de pérdida de respuesta debido a la acumulación de impurezas y la proteólisis. Durante los últimos años se ha producido un notable aumento en el acoplamiento de bioensayos electroquímicos a dispositivos portátiles basados en el empleo de SPEs, lo que ha contribuido a desarrollar dispositivos miniaturizados, fácilmente manejables, fiables y de bajo coste, capaces de proporcionar resultados en pocos minutos. Estos ensayos basados en el empleo de SPEs se han empleado para el análisis de multitud de analitos de diferente naturaleza, como contaminantes ambientales, hormonas, bacterias o marcadores de enfermedades entre otros [Fähnrich, 2003], [Wang, 2010^a], [Kumar, 2011].

Para posibilitar una mayor aceptación del empleo de biosensores en el campo medioambiental, de la salud y del análisis de alimentos, es necesario satisfacer las demandas de creación de pequeños dispositivos portátiles, que sean capaces de proporcionar el análisis de varios analitos a la vez en periodos de tiempo competitivos con las técnicas clásicas de análisis.

Es por esto que los sensores electroquímicos están jugando un papel cada vez más importante en todos estos campos, ya que son rápidos, de bajo coste y permiten el desarrollo de sistemas de medida en línea. El impulso de la utilización de micro y nanopartículas, y particularmente de las MBs, en el diseño de sensores electroquímicos, se debe, además de a sus ventajas de inmovilización específica, a la necesidad de desarrollar plataformas de detección más pequeñas, con las que se puedan alcanzar LDs más bajos. Además, con la aparición de la tecnología de serigrafiado, se ha producido un gran impulso en el empleo de SPEs para el desarrollo de sensores, que resultan muy ventajosos por su carácter desechable, por requerir el empleo de pequeños volúmenes de muestra, no necesitar tratamientos previos y permitir su producción en masa, lo que se traduce en un menor coste de la metodología.

Es de esperar que a partir de la combinación de la biología con la micro/nanotecnología y la electroquímica, sigan produciéndose grandes avances en el campo de los biosensores electroquímicos, que permitan su aplicación en diversos campos de estudio para satisfacer las demandas del análisis clínico en tiempo real.

2.3. MAGNETOSENSORES ELECTROQUÍMICOS DE DNA. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS.

DNA: Definición y estructura

En 1953, James Watson y Francis Crick descubrieron la estructura de doble hélice del DNA [Watson, 1953], que junto con el RNA, constituye el principal componente del material genético de la mayoría de los organismos, siendo el componente químico primario de los cromosomas y el material con el que los genes están codificados. La principal función del DNA es mantener, a través del código genético, la información genética necesaria para crear un ser vivo idéntico a su progenitor (o casi similar, en el caso de mezclarse con otra cadena como es el caso de la reproducción sexual o de sufrir mutaciones).

A diferencia de las proteínas, el DNA es una molécula lineal compuesta por cuatro monómeros y con una estabilidad térmica y química mucho más significativa que las primeras. Además, su mecanismo de síntesis y ensamblado es rápido y sencillo, y puede enlazarse específicamente a través de enlaces de hidrógeno a otra molécula de DNA de secuencia complementaria para formar la doble hélice [Lu, 2006].

Debido a la afinidad química que existe entre las bases, los nucleótidos que contienen adenina (A) se acoplan con los que contienen timina (T), y los que contienen citosina (C) con los que contienen guanina (G). Cada nucleótido se compone de un azúcar (2-desoxirribosa), una base nitrogenada (A, G, C ó T) y un grupo trifosfato; la 2-desoxirribosa se encuentra en forma de anillo furanósido, y se une a una base nitrogenada a través de una unión β -glicosídica en el carbono 1' y a un grupo trifosfato en el carbono 5' (Figura 3).

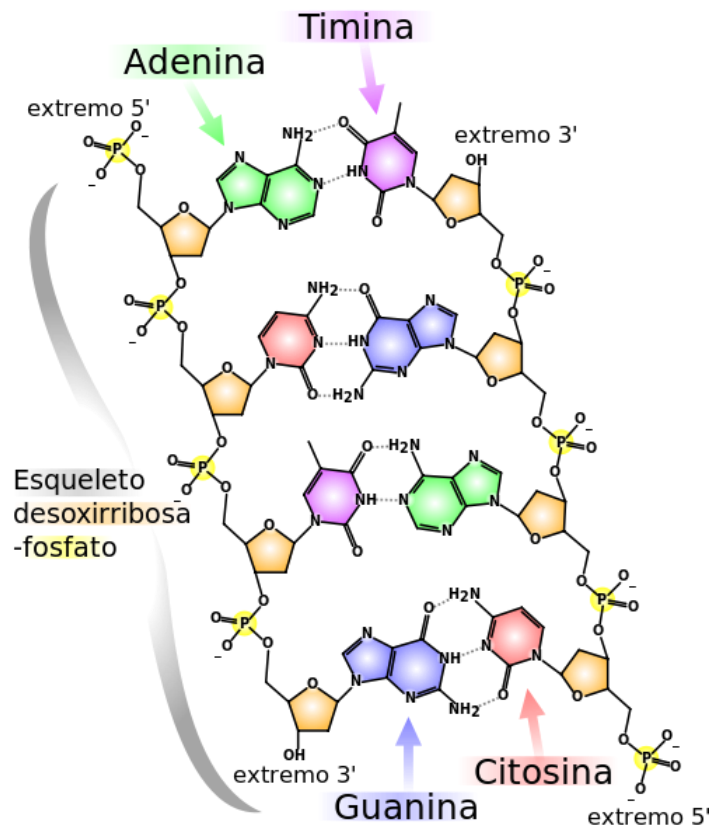


Figura 3. Estructura química de la doble hélice de DNA. Detalle de las cadenas de nucleótidos conectadas mediante enlaces de hidrógeno y de la formación de la unión fosfo-diéster entre los nucleótidos.

La cadena de DNA no es simétrica, se forma por uniones fosfodiéster de nucleótidos, en las que se libera un anión difosfato y un protón, formándose a través de la reacción de un grupo trifosfato de un nucleótido (ubicado en el carbono 5' de la desoxirribosa) con el OH de otro nucleótido (ubicado en el carbono 3'). Un nuevo nucleótido siempre se adicionará en el extremo 3'.

La reacción mediante la cual dos cadenas de DNA se unen para dar una doble cadena se denomina proceso de **hibridación**, y la reacción inversa, desnaturalización, que en el caso de producirse por un aumento de temperatura se denomina *melting*. En este proceso se rompen los puentes de hidrógeno que unen las cadenas produciéndose la separación de las mismas, pero no se rompen los enlaces fosfodiéster covalentes que forman la secuencia de la cadena; se trata de un proceso

reversible, ya que al bajar la temperatura lentamente se puede volver a dar la hibridación. En general, la hibridación y desnaturalización son dos reacciones que constituyen un equilibrio dinámico entre los dos estados de cadenas individuales en forma de ovillos estadísticos y las cadenas dobles en forma de hélice, dependiendo la estabilidad de las dobles cadenas de varios factores, como la temperatura y/o el pH.

Aplicaciones actuales del DNA

El DNA presenta varias ventajas para su empleo como nanomaterial. En comparación con el RNA y las proteínas, las moléculas de DNA son más estables y menos susceptibles a la hidrólisis; además, las vías artificiales de síntesis y amplificación permiten crear secuencias de DNA bien definidas. El DNA se puede modificar con diferentes grupos funcionales y fluoróforos que le permiten conjugarse con nanopartículas y otras estructuras. Diversas líneas de investigación han demostrado el importante papel del DNA como molécula estructural en el desarrollo de la nanotecnología.

En paralelo con su implementación en el desarrollo de la nanotecnología, las funciones químicas del DNA se han ido extendiendo. A principios de 1990 se inició el desarrollo de los **aptámeros**, ácidos nucleicos de cadena sencilla (ssDNA y ssRNA) con tamaños entre 70 y 100 nucleótidos, capaces de reconocer de forma específica y con alta afinidad varios tipos de moléculas diana mediante un plegamiento tridimensional de su cadena [James, 2000]. Estos oligonucleótidos tienen una región central de tamaño variable y con una secuencia aleatoria, y dos regiones en los extremos de secuencia conocida, que permiten su amplificación por PCR. Son moléculas capaces de adoptar estructuras globulares, lo que les permite exhibir unas complejas y sofisticadas propiedades de reconocimiento molecular, siendo capaces de unirse de una manera estable y muy específica a sus dianas. La variedad de moléculas a las que pueden unirse es muy amplia, desde pequeñas moléculas inorgánicas y proteínas, células e incluso ciertas partículas virales [Ellington, 1990]. Estas moléculas se presentan como una alternativa real a los anticuerpos monoclonales en la investigación biomédica, tanto en el ámbito del diagnóstico, debido a su aplicación como sensores moleculares,

como en el terapéutico, ya que son capaces de interferir en las funciones biológicas de las moléculas diana.

Métodos convencionales de análisis de DNA

Los métodos convencionales para el análisis específico de secuencias genómicas incluyen la secuenciación de ácidos nucleicos y la hibridación, siendo esta última más utilizada en los laboratorios clínicos debido a su mayor simplicidad.

La **secuenciación de DNA** es un conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en un oligonucleótido de DNA. Los dos protocolos clásicos de secuenciación, el método de Maxam y Gilbert (método químico) y el método de Sanger (método enzimático) comparten el mismo principio, la obtención de moléculas de cadena sencilla a partir del fragmento de cadena doble que se desea secuenciar. Las moléculas de DNA obtenidas están marcadas radiactivamente en uno de sus extremos, siendo sometidas a continuación a un conjunto de cuatro reacciones específicas para cada una de las bases. Cada reacción genera un conjunto de fragmentos que, al separarlos por electroforesis, permiten la lectura y la obtención de la secuencia de bases. Las moléculas de RNA también se pueden secuenciar con estos métodos, previa conversión de sus secuencias en DNA complementario. A partir de estos dos métodos, han ido surgiendo numerosas alternativas hasta llegar a los métodos de secuenciación actuales.

La **reacción en cadena de la polimerasa (PCR)** es una técnica de biología molecular desarrollada en 1987 por Kary Mullis, basada en la amplificación de un fragmento de DNA específico, obteniéndose millones de copias del mismo. Esta técnica se fundamenta en la propiedad de las enzimas DNA-polimerasas para replicar hebras de DNA, aplicando ciclos alternos de altas y bajas temperaturas (**Figura 4**). El proceso de PCR por lo general consiste en una serie de 20 a 35 ciclos, consistiendo cada uno de ellos en 2-3 pasos a diferentes temperaturas. Los pasos de ciclos a menudo están precedidos por un choque térmico a alta temperatura (> 90 °C), seguido por otro al final del proceso para la extensión de producto final o su conservación. Cada nueva

doble cadena de DNA actúa como molde para un nuevo ciclo, obteniéndose así una amplificación exponencial. La presencia de la secuencia amplificada se detecta posteriormente por electroforesis en gel.

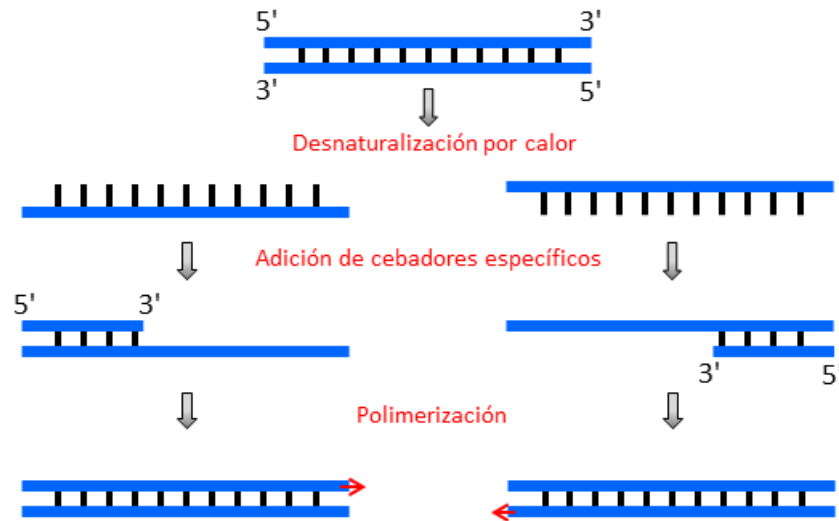


Figura 4. Representación esquemática de un ciclo de PCR.

Existen diferentes tipos de PCR, entre los que se van a destacar algunos ejemplos.

La PCR asimétrica directa (daPCR) es una variante de la técnica PCR asimétrica (aPCR), es decir, es una técnica de amplificación de fragmentos de DNA por PCR que produce predominantemente fragmentos de cadena sencilla al utilizar los dos cebadores necesarios a concentraciones molares distintas [Wu, 2011]. La particularidad de la daPCR reside en que el DNA molde no ha sido extraído previamente de la célula, logrando con ello acortar el tiempo y evitar el uso de reactivos innecesarios. El paso crítico de este tipo de técnica es la eficiencia en la permeabilización de las células con objeto de liberar el DNA para que pueda hibridar con los cebadores específicos. De esta forma se produce DNA de doble cadena en cantidad exponencial hasta que se agota el cebador minoritario, y luego sólo se produce la cadena que hibrida con el DNA que se encuentra en exceso, produciéndose a partir de entonces de forma lineal. Así, el producto de daPCR es una mezcla que

contiene más DNA monocatenario que bicatenario, lo que permite que el DNA monocatenario pueda emplearse para hibridar con una sonda de DNA inmovilizada sobre un soporte sin necesidad de desnaturalizar previamente la mezcla de PCR.

Por otra parte, la inmuno-PCR es una técnica que combina las ventajas de las técnicas inmunológicas y moleculares, y se basa en la unión de un antígeno a un soporte sólido utilizando un anticuerpo, y la posterior amplificación por PCR de un DNA conjugado a un anticuerpo o del DNA de la célula que actúa como antígeno. Una variación de esta técnica es la PCR-inmunomagnética, en la que los soportes sólidos empleados son MBs.

La PCR en tiempo real permite obtener resultados rápidos sin demasiada manipulación. Para llevar a cabo esta técnica existen varios métodos pero casi todos basados en la utilización de una sonda de DNA complementaria a una parte intermedia del DNA que se quiere amplificar. Esta sonda lleva adherida una molécula fluorescente y otra molécula que inhibe esta fluorescencia ("quencher"), de tal forma que sólo cuando la sonda es desplazada de su sitio por acción de la DNA-polimerasa la molécula fluorescente se libera de la acción del "quencher" y emite fluorescencia al ser iluminada con un láser. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de DNA que se está amplificando **[Kesmen, 2013]**, por lo que es posible seguir la amplificación en tiempo real, eliminando de esta manera los laboriosos pasos de post-amplificación tales como la electroforesis en gel.

Las aplicaciones de la PCR se han extendido a muchos campos; entre ellas se incluyen la secuenciación de DNA de muestras biológicas, la identificación de huellas genéticas y el diagnóstico de trastornos hereditarios y de enfermedades infecciosas.

Genosensores

La determinación de DNA ha adquirido una gran importancia en diversos campos, entre los que cabe destacar la medicina forense, bioseguridad, medio ambiente, alimentación y en la investigación y desarrollo de medicamentos. En la última década, se han desarrollado varios procedimientos y aplicaciones con el fin de

obtener dispositivos simples y portátiles para el diagnóstico de DNA. En este contexto, los **genosensores electroquímicos** reúnen la selectividad del proceso de hibridación con la sensibilidad, posibilidad de miniaturización, portabilidad y el bajo coste de los sistemas de detección electroquímicos [Lucarelli, 2004].

Un sensor de DNA consiste en una cadena sencilla de DNA inmovilizada sobre una superficie, que posteriormente se hibrida con una secuencia complementaria [Teles, 2008]. El aumento del interés en el desarrollo de sensores de DNA se debe a su inherente estabilidad físico-química, y a su capacidad para discriminar específicamente diferentes células diana. La rapidez, el alto rendimiento, la capacidad de automatización y el carácter desechable suponen algunas de las ventajas asociadas al desarrollo de genosensores. Sin embargo, un problema frecuente de la detección electroquímica de DNA son las interferencias en la hibridación, ya que la adsorción de secuencias de DNA no específicas o de marcadores enzimáticos en la superficie del electrodo puede reducir la sensibilidad del ensayo. Para resolver este problema, en los últimos años se ha estudiado la posibilidad de realizar la hibridación en la superficie de MBs, dando lugar a diferentes formatos de magnetogenosensores electroquímicos. Las MBs se han utilizado en nuevas estrategias para la detección electroquímica de procesos de hibridación de DNA, en superficies sensoras de DNA sin marcaje y en diferentes marcadores externos como enzimas o indicadores electroquímicos. En la **Tabla 2** se resumen algunas de dichas estrategias.

Tabla 2. Genosensores electroquímicos basados en el empleo de partículas magnéticas.

Material electródico	Modificación MBs	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de ensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
Electrodo de grafito	Strp-MBs	Hibridación específica	Marcadores tumores	BRCA1	–	AP y β -gal	Cronopotencio- metría y DPV (naftilfosfato y fenil-gal)	LD: 0.7 y 0.9 ng mL ⁻¹ para dos marcadores tumores	[Wang, 2002]
SPCE	Strp-MBs	Enlace específico	Trombina	–	Competitivo directo y Directo	AP	DPV naftilfosfato	LD: 430 nM y 175 nM	[Centi, 2008]
m-GEC	anti <i>Salmonella</i> - MBs y Strp-MBs	Afinidad específica	<i>Salmonella</i>	Leche	Directo	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.1$ V H_2O_2 -HQ	LD: 1 cfu mL ⁻¹ en medio de cultivo y LD: 0.04 cfu mL ⁻¹ en leche 1/10	[Liébana, 2009 ^a]
SPAUEs	Strp-MBs	Hibridación específica	Productos de PCR del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	Cultivos de bacterias	–	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.15$ V H_2O_2 -TTF	LD: 2.5 aM	[Loaiza, 2008]
SPAUEs	Strp-MBs	Hibridación específica	Productos de daPCR del gen <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i>	Cultivos de bacterias	–	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.15$ V H_2O_2 -TTF	LD: 0.01 cfu mL ⁻¹	[Loaiza, 2009]
SPCE y miEAu	Strp-MBs	Hibridación específica con sonda biotinilada	Cor a 1.04 (alérgeno avellana)	Amplicón de PCR	Sándwich	AP	DPV naftilfosfato y Cronoampero- metría (0.25 V vs. Ag/AgCl)	LD: 0.2 nM	[Berti, 2009]

Tabla 2. Genosensores electroquímicos basados en el empleo de partículas magnéticas (Continuación).

Material electródico	Modificación de MBs	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de ensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
Electrodo de mercurio	ProtG-MBs	Afinidad específica por la región Fc del Antip53	DNAs (circulares y con extremos libres)	–	Competitivo	–	CV	–	[Němcová, 2010]
Electrodo de disco de oro	DNAzyme- MBs	Hibridación específica	Pb ²⁺	–	–	Ferroceno	SWV 250 – 600 mV	IL: 0.1 – 75 nM LD: 37 pM	[Zhuang, 2013]
GCE	HOOC-MBs	Covalente	[•] OH	–	Directo	AgNPs	ASV -0.5 V	IL: 0.05 – 4 μM LD: 10 nM	[Yang, 2013]
SPCE array	Strp-MBs	Hibridación específica	mRNAs	–	Sándwich	AP-Strp	LSV Naftilfosfato	LD: 0.114 μg mL ⁻¹	[Erdem, 2013]

Abreviaturas utilizadas: AgNPs: nanopartículas de plata; AP: fosfatasa alcalina; ASV: voltamperometría de redisolución anódica; β-gal: β-galactosidasa; BRCA1: secuencias del gen del cáncer de mama; CV: voltamperometría cíclica; daPCR: reacción en cadena de la polimerasa asimétrica directa; DNA: Ácido desoxirribonucleico; DNAzyme: enzimas de DNA; DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; Fc: región constante del anticuerpo; fenil-gal: fenil β-D-galactosidasa; GCE: electrodo de carbono vitrificado; HRP: peroxidasa de rábano; HQ: hidroquinona; IL: intervalo lineal; LD: límite de detección; LSV: voltamperometría de barrido lineal; MBs: partículas magnéticas; m-GEC: magnetocompósito grafito-epoxi; miEAu: microelectrodo de oro; mRNA: ácido ribonucleico mensajero; p53: proteína supresora de tumores; ProtG: proteína G; SPAuEs: electrodos serigrafiados con pasta de oro; SPCE: electrodo serigrafiado de carbono; Strp: estreptavidina; SWV: voltamperometría de onda cuadrada; TTF: tetratíafulvaleno.

En el trabajo de Liébana y col. [Liébana, 2009^a] se emplearon varios tipos de MBs en el desarrollo de una metodología para la determinación de bacterias patógenas en muestras alimentarias. En un primer paso, la bacteria (*Salmonella*) se separaba de la muestra y se preconcentraba empleando anti *Salmonella*-MBs; posteriormente se realizaba una lisis celular para liberar el DNA bacteriano y se amplificaba mediante PCR. Por último, se emplearon Strp-MBs para inmovilizar el amplicón obtenido a través de su extremo biotinilado, que posteriormente hibridaba con una sonda complementaria marcada con digoxigenina, a la que se unía un anticuerpo de detección marcado con HRP para llevar a cabo la detección amperométrica. La aplicabilidad del método se demostró mediante el análisis de muestras de leche inoculadas, obteniéndose un LD de 0.04 cfu mL⁻¹. Dicha metodología representaba una alternativa rápida y sensible a las técnicas clásicas de aislamiento bacteriano y ensayos bioquímicos de confirmación.

Otro ejemplo de aplicación de MBs para el desarrollo de sensores de DNA es un sistema dual de determinación enzimática electroquímica [Wang, 2002], que combinaba la elevada sensibilidad del marcaje enzimático con la eliminación eficaz de las sondas de DNA no hibridadas proporcionada por la separación magnética. La elevada sensibilidad, asociada con la amplificación enzimática, permitía la determinación simultánea de bajos niveles (0.7 ng mL⁻¹) de diferentes marcadores tumorales relacionados con el cáncer de mama.

Centi y col. [Centi, 2008] aprovecharon la especificidad de los aptámeros para desarrollar un sensor electroquímico para la determinación de trombina, importante enzima presente en el plasma para la coagulación de la sangre. Compararon distintos tipos de formatos de ensayo, cuyo aspecto innovador fue la inmovilización previa de dichos aptámeros sobre MBs.

Se han utilizado Strp-MBs modificadas con una sonda de captura biotinilada en un formato tipo sándwich con una sonda de detección marcada con Strp-AP para desarrollar un magnetogenosensor basado en detección electroquímica por DPV para la determinación de un alérgeno de la avellana [Berti, 2009]. Los autores compararon

el sistema de detección convencional con uno de multidetección comercial, basado en una plataforma de microfluídica que integraba un conjunto de microelectrodos de oro, realizando en este caso medidas cronoamperométricas. El acoplamiento del magnetogenosensor con el sistema de microfluídica permitió determinar de manera reproducible secuencias de DNA a nivel nM.

Nuestro grupo de investigación tiene gran experiencia en el empleo de MBs para el desarrollo de sensores de DNA orientados a la determinación de organismos patógenos. Ejemplos de ello son los trabajos realizados por Loaiza y col. [Loaiza, 2008] y [Loaiza, 2009], que describen el desarrollo de magnetogenosensores amperométricos ultrasensibles y selectivos para la determinación de Enterobacterias, concretamente de *E. coli*, empleando SPAuEs como superficies electródicas en ambos casos. Las estrategias se basaban en la combinación de Strp-MBs y sondas biotiniladas específicas, para la detección de amplicones biotinilados de cadena sencilla marcados con HRP para llevar a cabo la detección electroquímica.

Una reciente estrategia para la determinación de microRNAs (miRNAs), importantes biomarcadores de distintas enfermedades (cáncer, Alzheimer, enfermedades cardiacas...), se ha basado una vez más en el empleo de Strp-MBs modificadas con una sonda de captura biotinilada específica para la detección del miRNA diana biotinilado marcado tras su hibridación [Erdem, 2013]. Se compararon diferentes superficies electródicas para llevar a cabo la detección electroquímica por LSV, entre las que destacaba un array de SPCE integrado en una plataforma de multidetección que permitió alcanzar las mejores características analíticas para la determinación del miRNA diana ($LD = 0.114 \mu g mL^{-1}$).

Todos estos trabajos son algunos ejemplos que muestran la utilidad de las MBs en el campo de los sensores electroquímicos de DNA, demostrando que se pueden evitar errores importantes asociados con adsorciones no específicas llevando a cabo los procedimientos de hibridación sobre dichas MBs y la posterior transducción electroquímica mediante su acoplamiento apropiado con diferentes superficies electródicas. Asimismo ofrecen las características de miniaturización, sensibilidad, bajo

coste y rapidez que se requieren en el desarrollo de sistemas de determinación de DNA.

2.4. MAGNETOINMUNOSENSORES ELECTROQUÍMICOS. GENERALIDADES Y ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Anticuerpos: definición y tipos

Los **anticuerpos**, también denominados inmunoglobulinas (Igs), son proteínas producidas de forma natural por el sistema inmunológico de los animales vertebrados, como respuesta a la presencia de sustancias extrañas potencialmente dañinas, denominadas antígenos. Las Igs tienen un peso molecular de 150 KDa, y están compuestas por dos cadenas polipeptídicas ligeras (L) iguales entre sí y dos pesadas (H), también iguales, unidas entre sí por puentes disulfuro y a una cadena ligera por otro puente disulfuro. Las cadenas presentan una región variable (V) que se sitúa en los dominios N terminales de cada cadena, y que son características de cada anticuerpo. Los dominios C terminales son secuencias de aminoácidos casi constantes, que constituyen la región constante del anticuerpo (C) (**Figura 5**); estas regiones presentan la misma secuencia de aminoácidos para inmunoglobulinas pertenecientes a la misma clase, difiriendo en los distintos tipos de inmunoglobulinas. La secuencia variable de los extremos amino terminales de cada cadena determina la especificidad antigénica de un anticuerpo concreto.

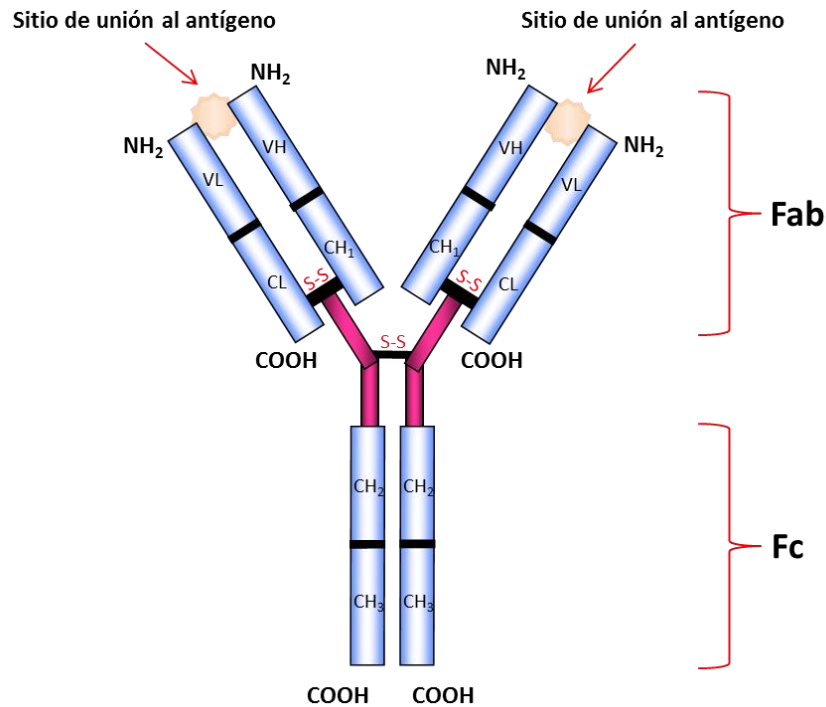


Figura 5. Representación de la estructura básica de una inmunoglobulina. Detalle de las cadenas pesadas de la región constante (CH), cadenas pesadas de la región variable (VH), cadenas ligeras de la región constante (CL), cadenas ligeras de la región variable (VL), sitios de unión al antígeno y de los enlaces disulfuro.

Desde 1989, se conoce la existencia de un tipo de anticuerpos derivados de camélidos y de peces cartilaginosos, también llamados nanoanticuerpos o “**nanobodies**”, que están compuestos únicamente por dos cadenas pesadas, siendo mucho más pequeños. Además, presentan un fragmento de unión al antígeno (región Fab) que carece de regiones constantes, estando conformado por un solo dominio variable, conocido como VHH en camélidos y como VNAR en tiburones, y que constituye la clave del nanoanticuerpo para el reconocimiento del antígeno [Wesolowski, 2009]. Tales peculiaridades les permiten acceder a localizaciones celulares y antígenos inaccesibles para los anticuerpos normales, como a centros activos de diversas enzimas y a las hendiduras de las membranas celulares, lo que sumado a su elevada estabilidad bajo condiciones extremas de pH y temperatura, está permitiendo su aplicación en el desarrollo de tratamientos para enfermedades como el cáncer o el Alzheimer, y constituir herramientas de interés para el desarrollo de biosensores y nuevos métodos de diagnóstico.

Inmunoensayos e inmunosensores

La alta especificidad y afinidad de un anticuerpo por su antígeno hace que los **inmunoensayos** presenten ventajas importantes (tiempo, sensibilidad...) frente a otros métodos convencionales. La elevada selectividad de los enlaces Ag-Ab les convierte en herramientas especialmente interesantes para el diagnóstico clínico, ya que las muestras (sangre, orina, suero...) contienen una gran cantidad de sustancias como proteínas, aminoácidos, hormonas o azúcares.

La interacción que tiene lugar entre un Ag y un Ab está basada en la formación de múltiples enlaces no covalentes (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, uniones de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas), interacciones que requieren una gran proximidad entre los grupos interactuantes; y aunque estas fuerzas de atracción son individualmente débiles en comparación con los enlaces covalentes, la multiplicidad de los enlaces conduce a una considerable energía de unión.

Los biosensores basados en anticuerpos, o **inmunosensores**, se definen como dispositivos analíticos que incorporan un material inmunológicamente activo (Ag o Ab), que está en contacto directo con la muestra, a un transductor, con el propósito de detectar reversible y selectivamente la concentración o actividad de determinadas especies químicas en una muestra [Jiang, 2008].

La principal ventaja de los inmunosensores es la estrecha unión que existe entre el material biológico y el transductor, lo que permite una detección más sensible de los cambios producidos en la interfase. La selectividad y sensibilidad del inmunosensor vienen determinadas por la especificidad y afinidad de la interacción Ag-Ab, por lo que debe optimizarse correctamente para el buen funcionamiento del dispositivo. Como se explicó anteriormente, las técnicas electroquímicas poseen diversas ventajas que las consolidan como métodos de transducción ampliamente utilizados. En función del tipo de inmunoensayo, los inmunosensores electroquímicos se clasifican en inmunosensores con detección electroquímica directa e inmunosensores con detección electroquímica indirecta.

En los **inmunosensores basados en inmunoensayos directos**, que se han desarrollado más enfocados al análisis cualitativo o semicuantitativo, la formación del complejo Ag-Ab se puede detectar directamente mediante medidas físicas. Las principales ventajas de estos análisis es que son de una etapa, junto con el trabajo sin marcadores que es muy atractivo, sobre todo para el desarrollo de inmunosensores *in vivo* que permiten realizar medidas en tiempo real sin adicionar reactivos peligrosos [Warsinke, 2000]. La señal de los inmunosensores directos es función del cambio en las propiedades de la superficie del transductor como consecuencia de la formación del complejo Ag-Ab. Se han desarrollado inmunosensores electroquímicos directos basados en la detección de cambios de potencial (potenciométricos), de intensidad de corriente (amperométricos) y en medidas de capacitancia y conductimetría.

En los **inmunosensores electroquímicos indirectos** las reacciones de afinidad se visualizan indirectamente por una reacción auxiliar con un compuesto marcado. Entre la gran variedad de marcadores que existen, destacan los marcadores enzimáticos como la peroxidasa, glucosa oxidasa, fosfatasa alcalina o catalasa y los compuestos electroactivos como el ferroceno. Los formatos indirectos presentan ciertas ventajas, como el aumento en la sensibilidad y una excelente reproducibilidad. Estos inmunoensayos pueden dividirse en heterogéneos y homogéneos según se realicen o no etapas de separación, y en competitivos y no competitivos según uno de los reactivos inmunológicos sea o no limitante.

En los ensayos competitivos, el analito sin marca y el analito marcado compiten por los puntos de unión de un anti-analito que está presente en una cantidad limitada. Tras un tiempo de incubación, la fracción libre (sin reaccionar) o enlazada (que ha reaccionado) del reactivo inmunológico marcado se cuantifica y se relaciona con la concentración inicial de analito en la muestra. En este tipo de inmunoensayos se inmoviliza el anticuerpo anti-analito sobre un soporte sólido normalmente por adsorción física o unión covalente, y la parte de la superficie sólida que no ha sido cubierta se bloquea con una proteína, añadiéndose a continuación la muestra que contiene el analito y el analito marcado. Puesto que los sitios de unión del anticuerpo anti-analito son limitados, cuanto mayor sea la concentración de analito de la muestra,

menor será la cantidad de reactivo inmunológico marcado inmovilizado sobre la superficie y menor será la señal medida.

Por otra parte, en los ensayos no competitivos se trabaja con exceso de uno de los reactivos inmunológicos, de modo que todo el analito está formando parte del complejo inmunológico. Después, se cuantifica y relaciona con la concentración del analito en la muestra. En estos inmunoensayos la modalidad tipo sándwich es la más popular, en la que el analito interacciona con el anticuerpo inmovilizado sobre la fase sólida y, a continuación, un segundo anticuerpo marcado reacciona con el analito que ha quedado retenido sobre la superficie. Los ensayos no competitivos también se utilizan para la determinación de anticuerpos; primero se fija el Ag (que también puede ser una inmunoglobulina) sobre la superficie, se deja reaccionar con la muestra que contiene el Ab y se cuantifica la cantidad de anticuerpo enlazada con una anti-inmunoglobulina marcada.

Un gran número de inmunoensayos descritos en la bibliografía están basados en la detección electroquímica de inmunoagentes marcados, ya que este tipo de detección presenta varias ventajas frente a los métodos ópticos: en algunos casos puede ser más sensible, no requiere propiedades de transparencia óptica y, además, permiten inmovilizar una mayor cantidad de los inmunoagentes incrementando el área efectiva del soporte sólido. Los soportes sólidos con una gran superficie efectiva no son transparentes y difícilmente pueden usarse para desarrollar inmunosensores ópticos.

Como se ha introducido anteriormente, un **magnetoinmunosensor** es aquel inmunosensor que integra en su desarrollo un material magnético en forma de micropartículas funcionalizadas con diversos grupos enlazantes que permiten la inmovilización del inmunoreactivo de manera sencilla. El uso de MBs mejora el rendimiento de la reacción de afinidad debido no sólo a que el área superficial es más elevada, sino también porque la cinética de la reacción es más rápida; además, la superficie electródica activa resulta más accesible para la difusión del producto enzimático.

Las diferentes configuraciones de magnetoinmunosensores se han empleado para la determinación de analitos de interés en las áreas del análisis ambiental, de alimentos y clínico. Con el fin de ilustrar la utilidad de esta metodología, en la **Tabla 3** se muestran algunos ejemplos de inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de partículas magnéticas.

Tabla 3. Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de partículas magnéticas.

Material electródico	Tipo de MBs	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de Inmunoensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
Electrodo de oro	Strp-MBs	Afinidad específica por el anticuerpo biotinilado	<i>E. coli</i>	Cultivos de bacterias	Directo	–	EIS 100 mHz – 100 KHz	IL: $10 - 10^4$ cfu mL ⁻¹	[Maalouf, 2008]
m-GEC	Tosilo-MBs	Covalente	Ácido fólico	Leche	Competitivo indirecto	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.15$ V H ₂ O ₂ -HQ	LD: 5.8 µg L ⁻¹	[Lermo, 2009]
m-GEC	anti <i>Salmonella</i> - MBs	Afinidad específica del anticuerpo por la bacteria	<i>Salmonella</i>	Leche	Sándwich	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.1$ V H ₂ O ₂ -HQ	LD: 5×10^3 cfu mL ⁻¹ en medio de cultivo y LD: 7.5×10^3 cfu mL ⁻¹ en leche 1/10	[Liébana, 2009 ^b]
SPCE	ProtA-MBs	Afinidad específica por la región Fc del anticuerpo	Cortisol	Suero humano	Competitivo directo	AP	DPV naftilfosfato	IL: $5.0 \times 10^{-3} -$ 150 ng mL ⁻¹ LD: 3.5 pg mL ⁻¹ EC ₅₀ : 0.19 ng mL ⁻¹	[Moreno- Guzmán, 2010]
SPCE	PANi-MBs	Adsorción física	<i>Bacillus cereus</i> y <i>E. coli</i> O157:H7	Cultivos de bacterias	Directo	PANi	CV -0.4 – 1.0 V HCl	LD: 40 cfu mL ⁻¹ y LD: 6 cfu mL ⁻¹	[Settingington, 2012]
SPCE	tTG-MBs	Afinidad específica del analito por el anticuerpo	Anti-tTG IgA	Suero humano	Directo	AP	DPV naftilfosfato	LD: 0.7 AU mL ⁻¹	[Adornetto, 2012]

Tabla 3. Inmunosensores electroquímicos basados en el empleo de micropartículas magnéticas (Continuación).

Material electródico	Tipo de MBs	Tipo de inmovilización	Analito	Muestra	Tipo de Inmunoensayo	Marcador	Sistema de detección	Características analíticas	Referencia
SPCE	His-Tag- Isolation- MBs y HOOC-MBs	Enlace específico y Covalente	Fibrinógeno	Plasma	Competitivo directo y Competitivo indirecto	HRP	Amperometría $E_{app} = -0.2$ V H_2O_2 -HQ	LD: $0.49 \mu\text{g mL}^{-1}$ y LD: $0.044 \mu\text{g mL}^{-1}$	[Campuzano, 2014]

Abreviaturas utilizadas: Anti-tTG IgA: anticuerpos IgA antitransglutaminasa tisular; AP: fosfatasa alcalina; cfu: unidades formadoras de colonias; CV: voltamperometría cíclica; DPV: voltamperometría diferencial de impulsos; *E. coli*: *Echerichia coli*; EIS: espectroscopia de impedancia electroquímica; Fc: región cristalizable del anticuerpo; HRP: peroxidasa de rábano; HQ: hidroquinona; IgA: inmunoglobulina A; IL: intervalo lineal; LD: límite de detección; MBs: partículas magnéticas; m-GEC: magnetocompuesto grafito-epoxi; PANi: polianilina; ProtA: proteína A; SPCE: electrodo serigrafiado de carbono; Strp: estreptavidina; tTG: transglutaminasa tisular.

Como puede observarse en la Tabla, el empleo de magnetoinmunosensores como sistemas selectivos para el reconocimiento de biomoléculas se ha ido extendiendo gracias a la posibilidad de utilizarlos como sistemas de detección específicos, sencillos y directos. Las principales ventajas de estas metodologías radican en la elevada sensibilidad proporcionada por la gran eficiencia del biorreconocimiento que tiene lugar sobre las MBs, la facilidad de separación de los analitos de sus respectivas muestras y la reducción del tamaño, coste y tiempo de análisis [Zhao, 2010].

Un ejemplo de magnetoinmunosensor electroquímico aplicable en el campo de la medicina deportiva es el desarrollado en nuestro grupo de investigación para la determinación de cortisol en suero humano [Moreno-Guzmán, 2010]. El esquema propuesto se basaba en un formato de tipo competitivo directo empleando cortisol marcado con AP. Para inmovilizar el anticuerpo se aprovechó la afinidad de la ProtA de las MBs empleadas por la región Fc de un anti-cortisol. Las MBs modificadas se capturaban magnéticamente sobre la superficie de un SPCE, adicionando como sustrato enzimático naftilfosfato, y registrándose la oxidación del producto de su hidrólisis mediante DPV. La sensibilidad alcanzada ($LD = 3.5 \text{ pg mL}^{-1}$) y la posibilidad de determinar dicha hormona en muestras de suero humano, demostraron la utilidad de la metodología desarrollada en el análisis clínico.

En otro trabajo realizado en nuestro grupo de investigación [Campuzano, 2014], se desarrollaron dos diseños de magnetoinmunosensores amperométricos para la determinación de fibrinógeno en plasma humano. Basándose en el uso de “nanobodies” (Nbs) se compararon dos tipos de inmunoensayo competitivo: directo e indirecto. En el formato competitivo directo se empleaban MBs disponibles comercialmente para la purificación de reactivos modificados con tag de histidinas, sobre las que se inmovilizaba un Nb específico clonado con este tag, y posteriormente se realizaba la etapa de competición con una disolución que contenía fibrinógeno libre y fibrinógeno biotinilado. En el formato competitivo indirecto, HOOC-MBs con una cantidad fija de fibrinógeno inmovilizada covalentemente con EDC/sulfo-NHS se incubaban con una disolución que contenía una cantidad fija de Nb biotinilado y una

concentración variable de analito. Previamente a la medida electroquímica, el marcaje enzimático se realizó en ambos formatos con Strp-HRP. Aunque el formato competitivo directo ofrecía mayor sensibilidad (LD $0.044 \mu\text{g mL}^{-1}$), las características analíticas obtenidas para las dos configuraciones demostraban su utilidad para la determinación de fibrinógeno en muestras de plasma humano.

Un ejemplo de magnetoinmunosensor electroquímico para la determinación de bacterias implicadas en procesos de contaminación alimentaria, es el desarrollado por Settingington y col. **[Settingington, 2012]**, que emplearon MBs modificadas con residuos de polianilina (PANi) para desarrollar un inmunosensor para la determinación de *Bacillus cereus* y *E. coli* O157:H7. Los anticuerpos se inmovilizaban sobre las MBs por adsorción física, realizando posteriormente una incubación con las disoluciones bacterianas. Posteriormente, las MBs modificadas se capturaban sobre la superficie de un SPCE y se realizaban las medidas por CV mediante adición de HCl 0.1 M. La presencia de células bacterianas diana inhibía significativamente el flujo de corriente entre la PANi electroactiva inmovilizada sobre las MBs y la superficie del electrodo, estableciéndose así el criterio de diferenciación. La combinación de la separación magnética con la técnica electroquímica posibilitó el desarrollo de un rápido método de cribado bacteriano.

En otro ejemplo de aplicación al análisis de bacterias, se empleaban MBs modificadas con un anticuerpo específico para la detección de *Salmonella* **[Liébana, 2009^b]**. Se realizaba un formato de tipo sándwich, en el que se empleaba HRP como marcador enzimático, y se registraban medidas amperométricas que eran proporcionales a la concentración de dicha bacteria. La aplicación del inmunosensor se demostró mediante el análisis de muestras de leche, alcanzándose un LD de 7.5×10^3 cfu mL^{-1} , lo que demostró su utilidad potencial como método rápido y selectivo para determinar bacterias patógenas en muestras alimentarias.

Un último ejemplo de magnetoinmunosensor es el desarrollado por Adornetto y col. **[Adornetto, 2012]** para la determinación de los anticuerpos IgA antitransglutaminasa tisular (anti-tTG IgA), marcadores de la enfermedad celíaca. En

este caso las MBs estaban modificadas con el antígeno (tTG), y posteriormente se incubaban con la muestra suplementada con un anticuerpo de detección marcado con AP capaz de reconocer y marcar enzimáticamente los anti-tTG presentes. El registro de las medidas electroquímicas se realizó por DPV, obteniéndose una sensibilidad de 0.7 AU mL^{-1} , lo que demostró la utilidad de la metodología descrita para su aplicación en el diagnóstico de esta enfermedad.

2.5. DETERMINACIÓN DE BACTERIAS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Definición y criterios de clasificación

Las **bacterias**, microorganismos unicelulares de tamaño de unos pocos micrómetros (entre 0.5 y 5 μm) y diversas formas (cocos, bacilos y espirilos), son células procariotas con una pared celular compuesta de peptidoglicano. Son los organismos más abundantes del planeta, ya que se multiplican rápidamente y pueden sobrevivir en condiciones ambientales muy extremas.

A pesar de que muchas son beneficiosas tanto para el medio ambiente como para el ser humano, un grupo de ellas resultan perjudiciales para la salud, denominándose bacterias patógenas, cuyo control es de suma importancia ya que son una de las principales causas de enfermedad y mortalidad humana. Por ejemplo, algunos organismos, tales como *Staphylococcus* o *Streptococcus*, que son parte de la flora humana y se encuentran generalmente en la piel o en la nariz sin causar enfermedad, pueden llegar a causar infecciones de la piel, pulmonía, meningitis e incluso sepsis.

Las bacterias pueden clasificarse atendiendo a diferentes criterios, como a su estructura celular, metabolismo o en base a determinados componentes (DNA, ácidos grasos, pigmentos, antígenos o quinonas). Sin embargo, aunque estos criterios permitían la identificación y clasificación de cepas bacterianas, no quedaba claro si estas diferencias representaban variaciones entre especies diferentes o entre distintas cepas de la misma especie. Por ello, la clasificación bacteriana actual se centra en el uso de técnicas moleculares modernas (filogenia molecular), tales como la determinación del contenido de guanina/citosina, la hibridación genoma-genoma o la secuenciación de DNA ribosómico.

Detección e identificación de bacterias

La identificación de bacterias en el laboratorio es particularmente relevante en ciertos campos como son la industria alimentaria, el control de aguas y medio ambiente y el diagnóstico clínico, donde la determinación de la especie causante de

una contaminación o infección es crucial a la hora de aplicar un correcto control o tratamiento. Por ello, la necesidad de identificar a los patógenos humanos ha dado lugar a un potente desarrollo de técnicas para su identificación. Los métodos más conocidos y empleados para la detección de bacterias son los que se basan en el cultivo y conteo de colonias, los métodos inmunológicos y la PCR.

Métodos tradicionales

Los estudios bacteriológicos suelen comprender el examen directo, el cultivo y el antibiograma en caso de ser necesario. El **examen directo** es un procedimiento rápido, que consiste en la observación microscópica de la muestra extendida en un portaobjeto, con o sin tinción. El **cultivo de muestras** consiste en el crecimiento *in vitro* de microorganismos en medios líquidos o sólidos permitiendo su aislamiento y la posterior identificación. Se utilizan diferentes medios selectivos para detectar especies de bacterias particulares, que pueden contener inhibidores (para detener o retrasar el crecimiento de las cepas que no sean de interés) o sustratos particulares que sólo la bacteria objetivo puede degradar o que les confieren un color especial a las colonias que crecen. La detección se lleva a cabo por métodos ópticos, fundamentalmente por inspección ocular. Este procedimiento es más lento, depende del tipo de bacteria, pudiendo tardar varios días o semanas. La técnica de **tinción de membranas bacterianas de Gram**, desarrollada por Hans Christian Gram en 1884, ha supuesto un antes y un después en el campo de la identificación de bacterias, y consiste en la aplicación de tintes específicos sobre las bacterias previamente crecidas en una placa, que posteriormente se limpian con alcohol etílico; en el caso de que la bacteria conserve el tinte será Gram positiva, y de lo contrario Gram negativa. Esta técnica también se emplea como primer paso en la distinción de diferentes especies de bacterias, considerándose Gram positivas a aquellas que toman un color violeta y Gram negativas a las que toman color rojo. En el análisis de muestras clínicas suele ser un estudio fundamental porque permite la identificación preliminar de la bacteria causante de la infección, apreciar el número de células inflamatorias y de células epiteliales y es de gran utilidad como control de calidad del aislamiento bacteriano. Estos métodos resultan tediosos y no siempre fiables, lo que sumado a los problemas de sensibilidad y especificidad, los convierten en sistemas poco rentables.

La confirmación definitiva de la presencia de bacterias se hace mediante diferentes métodos. Por ejemplo, uno de los métodos más empleados en el laboratorio clínico para diferenciar *S. pneumoniae* de *Streptococcus viridans* (*S. viridans*) es el de la **sensibilidad a la optoquina**, que consiste en una placa de agar-sangre inoculada en la que se coloca un disco impregnado con una disolución de optoquina que inhibe el crecimiento de las colonias del neumococo [Kaijalainen, 2002]. Otra prueba de confirmación bacteriana es la denominada **reacción de digestión capsular** o **reacción de Quellung**, que es una reacción bioquímica que usa anticuerpos polivalentes para que se unan y destruyan la cápsula de algunas bacterias como *S. pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae* y *Klebsiella pneumoniae*.

Métodos basados en el empleo de anticuerpos

Los métodos descritos hasta ahora resultan poco rentables y sensibles, por lo que en los últimos años se ha extendido el **uso de anticuerpos** para la identificación de bacterias, ya que es una metodología rápida y simple, que se puede automatizar y así trabajar con varias muestras al mismo tiempo. Por ejemplo, se han desarrollado sencillos **métodos de antigenuria**, demostrando que diferentes componentes antigénicos en la orina de microorganismos tales como *S. pneumoniae* y *Legionella pneumophila*, contribuyen a un diagnóstico fiable y rápido. Ya desde 1917 se empezó a considerar la detección de antígenos urinarios con distintas técnicas que hoy en día consisten fundamentalmente en contrainmunolectroforesis, aglutinación de látex, coaglutinación y enzimoimmunoanálisis. Ello se debe a que los antígenos microbianos se concentran en gran medida en la orina, en la que se puede asegurar que no existen anticuerpos que alteren el resultado. Pero no fue hasta finales de los años 90 cuando se desarrolló un método sencillo y rápido basado en la inmunocromatografía de membrana, Binax NOW®, que detecta el polisacárido C común a todos los serotipos y a patógenos como *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) y *Streptococcus oralis* (*S. oralis*), y el antígeno soluble del serogrupo 1 de *Legionella pneumophila* en la orina de pacientes infectados. Las limitaciones de éste método eran el elevado LD (1.0×10^5 cfu mL⁻¹), la baja selectividad hacia ciertos estreptococos (no permite discriminar *S. pneumoniae* de *S. mitis*) y bacterias patógenas y la escasa fiabilidad en pacientes pediátricos. La técnica

basada en la **separación inmunomagnética** (IMS) se puede utilizar para capturar y extraer una bacteria patógena de una muestra, mediante MBs convenientemente modificadas con elementos de captura específicos [Wang, 2014], evitando así etapas de preconcentración. La IMS se puede combinar con casi todos los métodos de detección. De entre los métodos de detección basados en técnicas inmunológicas, el más conocido es el ensayo **ELISA** (del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas); es una técnica de inmunoensayo en la que un antígeno inmovilizado se detecta mediante un anticuerpo marcado con enzima capaz de generar un producto detectable, como por ejemplo un cambio de color, permitiendo la medida indirecta del antígeno en la muestra mediante espectrofotometría. La interacción antígeno-anticuerpo en el laboratorio se puede utilizar para determinar si un paciente tiene una infección o una enfermedad autoinmune pero, aunque el procedimiento es rutinario y sencillo, involucra un gran número de variables, a veces da falsos positivos relacionados con reacciones inespecíficas, y requiere bastante tiempo, además de instrumentación cara y difícilmente miniaturizable.

Métodos basados en biología molecular

Por otro lado destacan los métodos basados en **biología molecular**, la mayoría basados en la hibridación de los ácidos nucleicos o en PCR. Estas técnicas moleculares de detección e identificación de microorganismos se basan en el análisis de los ácidos nucleicos extraídos directamente del microorganismo o bien de una muestra que lo contiene. Idealmente deberían proporcionar mayor sensibilidad (son capaces de detectar la presencia de un solo microorganismo) y especificidad, así como una mayor rapidez, y al poder ser automatizadas permiten reducir el coste. El uso de técnicas moleculares ha permitido identificar nuevos microorganismos, y estudiar poblaciones microbianas sin necesidad de aislamientos previos, con lo que se evitan los sesgos que pueden surgir con el cultivo. Además, permiten la detección de microorganismos altamente patógenos, que se pueden indentificar independientemente de si son viables y cultivables, evitando así los riesgos de infección.

Una de las técnicas moleculares más sencillas para identificar bacterias consiste en determinar por espectrometría el **porcentaje de guaninas y citosinas** presente en el DNA de una única colonia aislada. Sin embargo esta técnica no permite identificar especies y tiene muchos falsos positivos por lo que la mayoría de las veces se emplea un método complementario a los convencionales utilizados en el diagnóstico de las enfermedades infecciosas.

Las técnicas basadas en la **hibridación del DNA** se desarrollaron a partir del conocimiento de que dos cadenas sencillas de ácido nucleico con secuencias complementarias pueden hibridar para formar una doble cadena. La técnica más utilizada es la de los “polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción”, que consiste en extraer DNA de un cultivo puro de un microorganismo o de una muestra infectada y digerirlo con enzimas de restricción; posteriormente, estos fragmentos de DNA se separan por electroforesis y finalmente se hibridan con una sonda específica del microorganismo que se quiere identificar. Esta técnica, a pesar de ser muy específica, es lenta y poco sensible, y a veces implica el uso de radioactividad.

Pero la técnica más utilizada para la detección de microorganismos es la **PCR**, que se basa en el aislamiento, amplificación y cuantificación de una secuencia corta de DNA característica de la bacteria seleccionada. Esta técnica consume menos tiempo que las técnicas de cultivo y conteo y proporciona resultados en periodos de tiempo comprendidos entre 5 y 24 h (dependiendo de la variante específica de la PCR utilizada). Una de las limitaciones de la PCR radica en no poder discriminar entre células viables y no viables; para solventar esta limitación surgió una variante de la técnica capaz de detectar solamente células viables, la PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR). En esta variante una hebra de RNA es retrotranscripta en DNA complementario (DNAc) usando una enzima llamada transcriptasa inversa (RT), y el resultado, se amplifica en una PCR tradicional. De esta forma se pueden detectar específicamente varios genes presentes durante la fase de crecimiento de la bacteria [Falentin, 2012].

Control de bacterias en la industria alimentaria

El análisis para evaluar los contaminantes químicos y biológicos en la industria alimentaria es una práctica de crucial importancia para garantizar la seguridad y calidad de los alimentos de consumo. Los métodos convencionales para la detección de bacterias dependen de medios de cultivo microbiológicos específicos para aislar y enumerar las células bacterianas viables del alimento, métodos sensibles y de bajo coste, pero que requieren de varios días para proporcionar resultados ya que se basan en la capacidad de multiplicación de los microorganismos.

El control de la seguridad alimentaria ha sufrido un gran cambio durante los últimos años, pasando del formato del control del producto final, lo que implicaba el análisis de un elevado número de muestras para decidir sobre la seguridad de un lote, al control durante el proceso de fabricación. El sistema más efectivo para garantizar la seguridad alimentaria es el **APPCC** (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos), que identifica riesgos específicos y medidas para su control, y puede aplicarse en cualquier punto de la cadena alimentaria, facilitando las inspecciones de las autoridades reguladoras. Con la implantación de este sistema se incrementó la demanda de métodos rápidos, sensibles y precisos para detectar contaminantes biológicos y químicos; en particular, de métodos que puedan llevarse a cabo en minutos u horas y que permitan tomar medidas correctoras cuando se detectan los contaminantes [Cerf, 2011].

Biosensores para la determinación de bacterias

Dentro del conjunto de los métodos de identificación y detección de bacterias aparecen los biosensores, que ofrecen la posibilidad de detectar agentes patógenos en tiempo real, de manera rápida y específica. Se han descrito muchos ejemplos en la bibliografía sobre el desarrollo de biosensores para la detección de bacterias, en los que habitualmente se utilizan tres tipos de elementos de reconocimiento biológico: anticuerpos, ácidos nucleicos y enzimas, aunque estas últimas tienden a emplearse como marcadores más que como elementos de reconocimiento de bacterias.

Dentro del conjunto de biosensores electroquímicos se han desarrollado diferentes ejemplos para la detección de bacterias patógenas y toxinas. Así por ejemplo, Zhang y col. [Zhang, 2009] han descrito un método muy sensible basado en un inmunosensor electroquímico para la detección de *E. coli* en aguas terrestres. Mediante el empleo de nanopartículas metálicas de cobre recubiertas de oro como marcadores de los anticuerpos y ASV como técnica de detección fueron capaces de determinar 3 cfu mL⁻¹. La detección amperométrica de microorganismos se ha utilizado ampliamente, e implica la medida de la corriente generada por la oxidación/reducción catalizada por enzimas o por reacciones de bioafinidad en la superficie del electrodo de trabajo. Como se ha comentado anteriormente, los biosensores amperométricos presentan ciertas ventajas, como su sensibilidad, tamaño, robustez, rapidez, bajo coste y facilidad para ser usados fuera del laboratorio de trabajo para realizar análisis descentralizados. Como ejemplo, Sharma y col. [Sharma, 2006] detectaron *Vibrio cholerae* O1 en aguas subterráneas y de mar (8 cfu mL⁻¹) y en aguas de grifo y fecales (80 cfu mL⁻¹) en tan sólo 55 min mediante el empleo de un inmunosensor amperométrico y SPCEs. Lee y col. [Lee, 2009], por otro lado, describieron un método rápido y selectivo para monitorizar el crecimiento de coliformes en leche basado en un sensor amperométrico. El sistema era capaz de determinar la concentración de células de *E. coli* mediante la detección de la variación de la corriente causada por la reacción de oxidación-reducción del azul de metileno producida por el metabolismo bacteriano en las muestras de leche. Con dicha metodología alcanzaron un LD de 10⁵ cfu mL⁻¹, demostrando la utilidad del sensor para el análisis de muestras en las centrales lecheras.

Algunos de los métodos de determinación bacteriana descritos siguen presentando ciertas limitaciones, como la de no alcanzar los niveles de detección que ofrecen los métodos convencionales. Aún así, el futuro de los métodos de detección e identificación de bacterias y otros tipos de microorganismos patógenos tiende hacia el desarrollo de biosensores que puedan competir con las técnicas clásicas de análisis al permitir una determinación rápida, selectiva y económica.

2.5.1. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE *Streptococcus pneumoniae*

El neumococo, *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), es una bacteria Gram-positiva encapsulada e inmóvil, perteneciente al grupo α -hemolítico del género *Streptococcus*. Tiene forma oval y extremo distal lanceolado (**Figura 6**) y suele presentarse en forma de parejas, por lo que antiguamente se le denominaba *Diplococcus pneumoniae*. Se trata de un microorganismo microaerófilo, catalasa negativo y perteneciente al grupo de las bacterias ácido lácticas [Harvey, 2008].

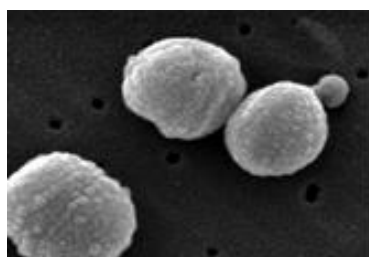


Figura 6. *Streptococcus pneumoniae*.

El neumococo es un importante patógeno humano, causante de un gran número de infecciones (neumonía, otitis media, peritonitis...) y de procesos invasivos severos (meningitis, septicemia...) que a pesar de contar con un tratamiento antibiótico eficaz, representa una de las principales causas de morbilidad, principalmente en la población más sensible como ancianos, niños y personas inmunodeprimidas. Su hábitat natural es la conjuntiva ocular y la nasofaringe, donde puede detectarse en un 5-10 % de adultos sanos y hasta en un 20-40 % de niños [Yao, 2008].

El principal factor de virulencia del neumococo es la cápsula de polisacárido, que impide su fagocitosis y facilita la clasificación de los 91 serotipos conocidos. Esta cápsula está formada por componentes antifagocíticos y antigénicos, resultando unas cepas altamente invasivas [Mitchell, 2000], [Dortet, 2009]. El mecanismo de invasión de las células encapsuladas se basa en la ocupación de los alveolos pulmonares, induciendo una fuerte respuesta inflamatoria, que provoca una disminución de la función pulmonar a causa de la masiva acumulación de fluidos y células fagocíticas. La

infección puede extenderse produciendo bacteriemia, infección en huesos, oído interno y endocardio, y en el caso de que la neumonía no se trate adecuadamente, puede ocasionar la muerte. La neumonía neumocócica tiene una tasa de mortalidad de hasta el 30 % dependiendo de la bacteriemia, edad y enfermedades subyacentes del paciente [Madigan, 2004].

Los métodos convencionales para el diagnóstico de neumonía neumocócica se han basado tradicionalmente en el cultivo de muestras respiratorias o sanguíneas que se caracterizan por resultar complejos, tediosos y no siempre fiables.

Respecto al cultivo de muestras respiratorias, una vez caracterizado el estreptococo mediante una tinción de Gram y el carácter catalasa-negativa, se realiza el cultivo de la muestra de esputo. El resultado no se tiene hasta transcurridas 48 h como mínimo, lo que sumado a los problemas de sensibilidad y especificidad del método, lo convierten en un sistema poco atractivo.

En el hemocultivo, la bacteria se siembra en una placa de agar-sangre y, tras 24 h se examina para detectar la existencia de α -hemólisis, que se manifiesta por la aparición de un halo verdoso alrededor de las colonias. Este método también presenta los problemas del tiempo y la baja sensibilidad; además, el diagnóstico de neumonía neumocócica por hemocultivo sólo es útil en el 10-30 % de los pacientes que llegan a ser bacteriémicos.

La confirmación definitiva de la presencia de neumococo se hace mediante la prueba de la sensibilidad a la optoquina, la solubilidad en bilis o la reacción de digestión capsular.

Explicada la patogenicidad del *S. pneumoniae*, se comprende mejor la necesidad que existe de una detección rápida de su presencia en las diferentes muestras clínicas para comenzar cuanto antes el tratamiento antibiótico. En este sentido, el desarrollo de sistemas basados en biosensores resulta de gran interés, ya que estos métodos dan lugar a resultados tan fiables como los ensayos tradicionales

pero en tiempos mucho más cortos. En particular, los inmunosensores y genosensores se consideran hoy en día como los más atractivos, debido a su sencillez, bajo coste de la instrumentación y posibilidad de detección inequívoca en tiempo real con límites de detección muy bajos [Lucarelli, 2008]. A continuación se resumen algunas de las plataformas sensoras descritas hasta el momento para la determinación del *S. pneumoniae* (Tabla 4).

Tabla 4. Biosensores para la determinación de *S. pneumoniae*.

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Inmunoensayo basado en la conjugación del polisacárido de la pared celular de <i>S. pneumoniae</i> y la posterior incubación con Abs específicos	Inmunosensor de fibra óptica	–	–	[Marks, 2000]
Sándwich dot-ELISA	ELISA	Líquido cefaloraquídeo	LD: 1.25 µg mL ⁻¹	[Rai, 2004]
Genosensor basado la inmovilización de las sondas de DNA sobre SPCEs mediante interacción Biotina-Strp y marcaje con AP	CV (–0.25 - +0.20 V) (3-IP)	–	LD: 0.49 fmol	[Hernández-Santos, 2004]
Genosensor basado la inmovilización de las sondas de DNA sobre SPCEs mediante interacción Biotina-Strp	Amperometría (E _{app} = –1.40 V vs. Ag/AgCl)	–	IL: 5 – 100 pg µL ⁻¹ LD: 5 pg µL ⁻¹	[Hernández-Santos, 2005]
Inmunosensor para la toxina <i>ply</i> tipo sándwich basado en la inmovilización de los Abs sobre SPCEs mediante enlace Biotina-Strp y marcaje enzimático con AP	CV (–0.25 - +0.20 V) (3-IP)	Orina	IL: 0.25 – 5.0 ng mL ⁻¹ LD: 0.12 ng mL ⁻¹	[Díaz-González, 2006]
Genosensor basado en el empleo de SPCEs modificados con Strp y sondas biotiniladas para la determinación del gen <i>lytA</i> específico de <i>S. pneumoniae</i>	ASV (3-IP/Ag ⁺)	–	IL: 7 – 700 fg µL ⁻¹ LD: 7 fg µL ⁻¹	[Fanjul-Bolado, 2007]
Inmunosensor para detección de <i>ply</i> específica de <i>S. pneumoniae</i> basado en la inmovilización de Abs a la superficie de un electrodo de oro mediante el empleo de monocapas	SWV (3-IP)	–	IL: 0.1 – 10 ng mL ⁻¹	[Vallina-García, 2007]
Test inmunocromatografía basado en Abs específicos para la detección del polisacárido C de <i>S. pneumoniae</i>	Detección colorimétrica	Espuito	LD: 0.75 ng mL ⁻¹	[Ehara, 2008]

Tabla 4. Biosensores para la determinación de *S. pneumoniae* (Continuación).

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Biosensor para la determinación de H ₂ O ₂ mediante el empleo de un electrodo compósito de grafito-teflón-peroxidasa/ferroceno	Amperometría (E _{app} = 0.00 V vs. Ag/AgCl)	–	LD: 2x10 ⁵ cfu mL ⁻¹	[Serra, 2008]
Genosensor basado en el empleo de SPCEs modificados con AuNPs. Inmovilización de las sondas de DNA mediante interacción tiol-Au (1) o Biotina-Strp (2)	CV (-0.005 - +0.4 V) (3-IP/Ag ⁺)	–	IL ₁ : 50 – 750 pM y 50 – 500 pM IL ₂ : 5 – 300 pM LD ₁ : 25 pM y 20 pM LD ₂ : 3 pM	[Martínez-Paredes, 2010]
Magnetogenosensor para la determinación del amplicón del gen <i>lytA</i> de <i>S. pneumoniae</i> obtenido por aPCR	Amperometría (E _{app} = -0.15 V vs. Ag/AgCl) H ₂ O ₂ -TTF	Orina Sangre	LD: 1.1 nM	[Campuzano, 2011]
Genosensor directo para la determinación de RNAm _t específico de <i>S. pneumoniae</i> . Inmovilización covalente de las sondas de captura.	Array de microanillos de resonancia	–	LD: 53 fmol	[Scheler, 2012]

Abreviaturas utilizadas: **Abs:** anticuerpos; **AP:** fosfatasa alcalina; **aPCR:** reacción en cadena de la polimerasa asimétrica; **ASV:** voltamperometría de redisolución anódica; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **cfu:** unidades formadoras de colonias; **CV:** voltamperometría cíclica; **DNA:** ácido desoxirribonucleico; **ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas; **IL:** intervalo lineal; **3-IP:** 3-indoxil fosfato; **LD:** límite de detección; **ply:** neumolisina; **RNAm_t:** ácido ribonucleico mensajero tranferente; **SPCE:** electrodo serigrafiado de carbono; **Strp:** estreptavidina; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **TTF:** tetratíafulvaleno.

Un ejemplo de sensor para la determinación de neumococo en muestras de orina es el descrito por Díaz-González y col., que desarrollaron un inmunosensor electroquímico para la detección de neumolisina (*ply*) [Díaz-González, 2006], una toxina producida por el *S. pneumoniae* asociada a citolisis. El inmunosensor, basado en un formato de tipo sándwich, consistía en la inmovilización de los anticuerpos anti-*ply* biotinilados sobre la superficie de SPCEs que había sido previamente oxidada y modificada con Strp. Después de la incubación con las disoluciones de los antígenos o las muestras, se realizaba una incubación con anticuerpos anti-*ply* que estaban marcados con la enzima AP. Mediante CV se detectaba el producto de la reacción enzimática en presencia del sustrato 3-IP. El LD obtenido fue de 0.12 ng mL⁻¹ en muestras de orina enriquecidas. Además, la aplicabilidad del método se demostró analizando varias muestras procedentes de pacientes de hospital.

Una estrategia similar, pero empleando esta vez un sensor de DNA, fue la desarrollada por Fanjul-Bolado y col. [Fanjul-Bolado, 2007], que diseñaron un genosensor basado en la modificación de la superficie de SPCEs con Strp, e inmovilizando posteriormente sondas biotiniladas específicas del gen *lytA* de *S. pneumoniae*, responsable de codificar la principal autolisina de la bacteria. Tras el proceso de hibridación con los oligonucleótidos diana marcados con fluoresceína, el complejo se incubaba con antiluoresceína marcada con AP y, tras la adición de 3-IP y Ag⁺, se obtenía un depósito metálico resultado de la reducción de los iones Ag⁺ presentes en disolución por el producto formado en la reacción enzimática. La medida por ASV del depósito de Ag formado permitió alcanzar un LD de 7 fg μL⁻¹.

Serra y col. desarrollaron un biosensor amperométrico para la identificación de la actividad catalasa de diversas bacterias, entre las que se encontraba el *S. pneumoniae* [Serra, 2008]. El biosensor, que consistía en un electrodo de material compuesto de grafito-teflón, peroxidasa y ferroceno, se basaba en la monitorización de H₂O₂, detectando su consumo o producción. El *S. pneumoniae* se empleó como bacteria modelo para identificar el carácter catalasa negativo, pudiéndose detectar 2x10⁵ cfu mL⁻¹ de la bacteria en tan sólo 15 min.

También en nuestro grupo de investigación se ha diseñado un genosensor amperométrico para la determinación de neumococo basado en el empleo de Strp-MBs y SPAuEs. En el procedimiento se empleaba una sonda de captura específica del gen *lytA* que estaba marcada con biotina y, tras su hibridación con la secuencia complementaria o no complementaria, se realizaba un proceso de marcaje mediante incubación con un polímero de Strp-HRP [Campuzano, 2011]. El LD obtenido para una secuencia diana sintética fue de 5.1 nM, que bajó a 1.1 nM para el amplicón obtenido a partir de una estrategia de aPCR. Asimismo, se aplicó la metodología a la detección de amplicones obtenidos por daPCR, demostrándose la aplicabilidad de la metodología para la detección en muestras clínicas inoculadas. La buena selectividad del método se demostró mediante el análisis de muestras inoculadas con otros estreptococos.

Por último, cabe destacar el trabajo de Scheler y col. [Scheler, 2012], en el que desarrollaron una plataforma de multidetección para la determinación directa de RNAm_t específico de *S. pneumoniae* con un genosensor piezoeléctrico basado en la inmovilización covalente de las sondas de captura. La sensibilidad de la bioplataforma permitía la detección de valores inferiores a 53 fmol de RNAm_t de neumococo, lo que equivaldría aproximadamente a 3.16×10^7 cfu mL⁻¹ de la bacteria.

2.5.2. BIOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

El *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) es una bacteria inmóvil, Gram-positiva, productora de coagulasa, catalasa positiva y no esporulada [Emaneini, 2011]. Se trata de una bacteria esférica que aparece en forma de parejas, cadenas cortas o acumuladas como racimos de uva (Figura 7), que al ser anaerobia facultativa puede crecer mediante respiración aeróbica o por fermentación, produciendo principalmente ácido láctico. Esta bacteria se encuentra ampliamente distribuida, forma parte de la flora de la piel y también se encuentra en la cavidad oral, nariz y tracto gastrointestinal; se estima que hasta el 30-50 % de la población humana es portadora.

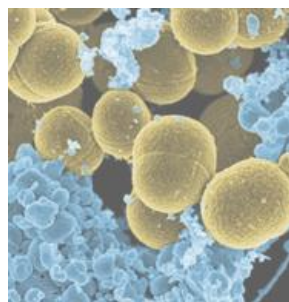


Figura 7. *Staphylococcus aureus*.

Es uno de los principales agentes patógenos [Huang, 2010], pudiendo causar diversas enfermedades, desde infecciones leves de la piel hasta enfermedades como neumonía, meningitis, osteomielitis y endocarditis [Huang, 2008^a]. Además, es una de las principales causas de procesos de gastroenteritis debidos al consumo de alimentos contaminados con la propia bacteria o con alguno de los tipos de enterotoxina estafilocócica que produce [Boujday, 2008].

Esta bacteria puede crecer en condiciones extremas, como por ejemplo en el intervalo de temperaturas comprendido entre 15 y 45 °C, de pHs entre 4.2 y 9.3 o a concentraciones de NaCl elevadas (del 15 %), características que hacen posible su crecimiento en una amplia gama de alimentos [Hamadi, 2014], por lo que el desarrollo de dispositivos para su detección resulta de suma importancia en la industria alimentaria.

Las pruebas de identificación de *S. aureus* se basan en técnicas de microscopía, de cultivo bacteriano y pruebas bioquímicas, siendo la más fiable para su identificación la prueba de la coagulasa. La evaluación de riesgos en los productos alimentarios depende de la detección microbiana clásica y cuantificación de coagulasa positiva *Staphylococci* en un medio selectivo Baird-Parker [Kozioł-Montewka, 2006]. La sensibilidad de estos ensayos de rutina está en 10^2 cfu g⁻¹ para productos alimenticios sólidos y 10 cfu g⁻¹ para muestras líquidas. En muchos países se toleran bajos niveles de contaminación por *S. aureus* en la mayoría de los productos alimenticios (en Francia, hasta 10^3 cfu g⁻¹ en quesos de leche cruda), no siendo considerados como un riesgo para la salud pública.

Entre los factores de virulencia que presenta la bacteria están hemolisinas citotóxicas, leucocidinas, enterotoxinas, el ácido teicoico y la ProtA. Esta última es el mayor componente de la pared celular de la bacteria, y está enlazada covalentemente a la estructura de peptidoglicanos. Además, algunas especies pueden producirla específicamente [Duggleby, 1983], de tal manera que puede usarse como indicador de la presencia del microorganismo en muestras clínicas y alimentarias.

Como ya se explicó anteriormente, la ProtA es un polipéptido de 42 kDa, cuya interacción con los anticuerpos se ha estudiado con gran detalle, ya que presenta cuatro lugares de unión potenciales a los mismos a través de las regiones constantes segunda y tercera de la cadena pesada [Movitz, 1976].

Atendiendo a la presencia de dicho factor de virulencia, se han desarrollado varios biosensores para la determinación de *S. aureus* o de la ProtA (Tabla 5). Muchos de estos biosensores se han basado en inmunoensayos acoplados a técnicas electroquímicas [Chen, 2008], [Lin, 2008], [Braiek, 2012], pero la sensibilidad alcanzada no siempre ha sido suficiente para cumplir los reglamentos de la seguridad alimentaria.

Tabla 5. Biosensores para la determinación de *S. aureus*.

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Inmunosensor basado en el empleo de MBs modificadas con grupos aldehído y Abs específicos de la ProtA	IMS-MS/SPR	–	IL: $1.0 \times 10^6 - 1.0 \times 10^7$ cfu mL ⁻¹ LD: 10^6 cfu mL ⁻¹	[Chen, 2007]
Inmunoensayos competitivo y tipo sándwich basados en la inmovilización de los inmunoreactivos sobre un electrodo de disco de oro mediante la formación de monocapas de MPA	Amperometría ($E_{app} = 0.00$ V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ -TTF)	–	LD: 1.6×10^5 células mL ⁻¹	[Escamilla-Gómez, 2007]
Inmovilización de un fago, empleado como elemento de biorreconocimiento, en la superficie del sensor	SPR	–	LD: 10^4 cfu mL ⁻¹	[Balasubramanian, 2007]
Inmovilización de anti-SEB marcado con HRP en superficie modificada con nAu, quitosán y MWCNT	Conductimetría	Leche	IL: $0.5 - 83.5$ ng mL ⁻¹ LD: 0.5 ng mL ⁻¹	[Chen, 2008]
Inmunoensayos competitivos basados en la inmovilización covalente de RbIgG y tirosinasa sobre un electrodo de disco de oro mediante formación de monocapas de MPA	Amperometría ($E_{app} = -0.15$ V vs. Ag/AgCl) (naftilfosfato y <i>o</i> -quinona)	Leche	IL: $4.4 \times 10^5 - 1.8 \times 10^7$ células mL ⁻¹ LD: 1.7×10^5 (lisis celular con ultrasonidos) y 2.3×10^3 células mL ⁻¹ (lisis celular con calor)	[Escamilla-Gómez, 2008 ^a]
Inmunoensayos competitivos basados en la inmovilización covalente de RbIgG sobre SPAuEs mediante formación de monocapa de DTSP y posterior adición de HRP-antiRbIgG	Amperometría ($E_{app} = 0.00$ V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂ -TTF)	Leche	IL: $1.3 \times 10^3 - 7.6 \times 10^4$ células mL ⁻¹ LD: 3.7×10^2 células mL ⁻¹	[Escamilla-Gómez, 2008 ^b]
Identificación del carácter catalasa positivo del <i>S. aureus</i>	Espectrofotometría UV/Vis (450 nm)-test cromatográfico para la determinación de H ₂ O ₂	Tofu	LD: 2×10^2 cfu mL ⁻¹	[Chai, 2011]
Inmunosensor basado en la inmovilización covalente de los Abs a la superficie electródica mediante monocapa de GPMS	EIS	–	LD: 10^2 cfu mL ⁻¹	[Tan, 2011]

Tabla 5. Biosensores para la determinación de *S. aureus* (Continuación).

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Genosensor desarrollado sobre electrodo de oro para la determinación del producto de PCR del gen <i>mecA</i> de <i>S. aureus</i>	EIS	Aislados clínicos	LD: 10 pM	[Corrigan, 2012]
Inmovilización de aptámeros anti <i>S. aureus</i> en superficie modificada con SWCNT	Potenciometría	Piel de cerdo	LD: 8×10^2 cfu mL ⁻¹	[Zelada-Guillén, 2012]
Modificación de un electrodo de carbono con nanocompósito de Co ₃ O ₄ /grafeno/quitosan para desarrollar un sensor de DNA para la determinación del gen <i>nuc</i> del <i>S. aureus</i>	DPV (MB)	–	IL: 1.0×10^{-12} – 1.0×10^{-6} M LD: 4.3×10^{-13} M	[Qi, 2012]
Empleo de bacteriófagos como elementos de reconocimiento para MRSA	SPR	–	LD: 10^3 cfu mL ⁻¹	[Tawil, 2012]
Inmunosensor basado en la inmovilización de Abs mediante la formación de monocapa de MPA	EIS	–	IL: $10 - 10^6$ cfu mL ⁻¹ LD: 10 cfu mL ⁻¹	[Braiek, 2012]
Inmunosayo competitivo acoplado a un multisistema luminiscente para la detección de los componentes de la pared celular del <i>S. aureus</i>	Detección de las células bacterianas capturadas por IgGs unidas a partículas luminiscentes	Suero	–	[Maňásková, 2013]
Nanocompósito de Abs/AuNPs/MBs para IMS de <i>S. aureus</i>	Filtración de las muestras y posterior detección colorimétrica de las AuNPs	Leche	LD: 1.5×10^5 cfu mL ⁻¹	[Sung, 2013]
Inmovilización de anti <i>S. aureus</i> sobre electrodo de Pt mediante entrecruzamiento con PEI-GA	Amperometría ($E_{app} = 0.80$ V vs. Ag/AgCl) (NADP-K ₃ Fe(CN) ₆)	Leche, queso y carne	IL: $10^1 - 10^8$ cfu mL ⁻¹ LD: 10 cfu mL ⁻¹	[Majumdar, 2013]
Inmunoensayo con MAbs específicos de la pared celular de peptidoglicano del <i>S. aureus</i> acoplado a un sistema de cromatografía de flujo lateral	LFI, sistema colorimétrico	Esputo y aspirado broncoalveolar	LD: 10^6 cfu mL ⁻¹	[Wiriyaichai, 2013]

Tabla 5. Biosensores para la determinación de *S. aureus* (Continuación).

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Desarrollo de un MIP basado en el empleo de organosilanos para la detección de diferentes serotipos de enterotoxinas estafilocócicas (A y B)	MIP-QCM	Leche	IL: 0.1 – 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ LD: 7.97 (SEA) y 2.25 (SEB) ng mL^{-1}	[Liu, 2014]

Abreviaturas utilizadas: **Abs:** anticuerpos; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **cfu:** unidades formadoras de colonias; **DNA:** ácido desoxirribonucleico; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **DTSP:** ácido 3,3'-ditiopropiónico di(N-succinimidil) éster; **EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica; **GA:** glutaraldehído; **GPMS:** 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano; **HRP:** peroxidasa de rábano; **IgG:** inmunoglobulina G; **IL:** intervalo lineal; **IMS:** separación inmunomagnética; **LFI:** inmunocromatografía de flujo lateral; **LD:** límite de detección; **MAbs:** anticuerpos monoclonales; **MB:** azul de metileno; **MBs:** partículas magnéticas; **MIP:** polímero de impresión molecular; **MPA:** ácido 3-mercaptopropanoico; **MRSA:** *S. aureus* resistente a la meticilina; **MS:** espectrometría de masas; **MWCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **NADP:** nicotinamida adenina dinucleótido fosfato; **PCR:** reacción en cadena de la polimerasa; **PEI:** polietilenimina; **ProtA:** proteína A; **QCM:** microbalanza de cristal de cuarzo; **RbIgG:** inmunoglobulina G de conejo; **SEA:** enterotoxina A de *S. aureus*; **SEB:** enterotoxina B de *Staphylococcus*; **SPAuE:** electrodo serigrafiado de oro; **SPR:** resonancia de plasmón superficial; **SWCNT:** nanotubos de carbono de pared simple; **TTF:** tetratíafulvaleno; **UV:** ultravioleta; **Vis:** visible.

La estrategia de emplear la IMS para la inmovilización de anticuerpos sobre la superficie de MBs y posteriormente emplear el complejo Abs-MBs para separar bacterias específicas de una disolución que las contiene, ha sido aplicada en numerosas ocasiones **[Pedrero, 2012]**, en muchos casos combinada con diferentes técnicas. Entre los ejemplos aplicados para el *S. aureus* está el trabajo de Chen y col. **[Chen, 2007]**, que combinaron la IMS con el desarrollo de un inmunosensor basado en el empleo de MBs modificadas con grupos aldehído a través de los que inmovilizaban Abs específicos de la bacteria. El procedimiento, con una duración de 2 h, se basaba en la separación de la bacteria mediante IMS, la detección de la ProtA de la bacteria mediante espectrometría de masas (MS) y por último la determinación del *S. aureus* mediante SPR ($LD = 10^6$ cfu mL⁻¹).

En nuestro grupo de investigación se han desarrollado varios inmunosensores amperométricos para *S. aureus*. A modo de ejemplo, Escamilla y col. desarrollaron dos nuevos diseños de inmunosensores amperométricos integrados para la cuantificación de la bacteria en muestras de leche, basados en la inmovilización covalente de anticuerpos (RbIgGs) sobre electrodos convencionales de disco oro mediante el empleo del ácido 3,3'-ditiopropiónico di(N-succinimidil) éster (DTSP) **[Escamilla-Gómez, 2008^b]**, un agente entrecruzante heterobifuncional no ensayado previamente en el desarrollo de inmunosensores electroquímicos. Ambos diseños se basaban en un formato tipo competitivo en el que la ProtA competía con un reactivo marcado (HRP-antiRbIgG o ProtA-HRP) por los sitios de unión disponibles del anticuerpo inmovilizado. Con objeto de reducir el coste y el tiempo de análisis, la configuración más exitosa analíticamente (antiRbIgG-HRP) se evaluó también con SPAuEs obteniéndose un LD un orden de magnitud inferior (3.7×10^2 cfu mL⁻¹) al límite máximo permitido para esta bacteria en muestras de alimentos.

Otro ejemplo de biosensor electroquímico para la determinación en tiempo real del *S. aureus* en la piel es el trabajo de Zelada-Guillén y col. **[Zelada-Guillén, 2012]**, basado en el uso combinado de aptámeros anti-*S. aureus* con SWCNT. Se estudiaron diferentes estrategias de funcionalización, resultando la más interesante para la determinación de la bacteria aquella basada en la oxidación de los SWCNTs para una

posterior unión covalente de los aptámeros. Con esta estrategia se alcanzó un LD de 8×10^2 cfu mL⁻¹, demostrándose la aplicabilidad del método mediante el análisis de muestras de piel porcina.

Majumdar y col. [Majumdar, 2013], desarrollaron un inmunosensor amperométrico de tipo sándwich basado en una estrategia de inmovilización muy estable de un anti-*S. aureus* sobre la superficie de un electrodo de platino recubierta de un polímero de polietilenimina (PEI) mediante una reacción de entrecruzamiento con glutaraldehído (GA). El inmunosensor, que conllevaba un procedimiento de 3.5 h de duración, y proporcionaba un LD de 10 cfu mL⁻¹, se aplicó al análisis de diferentes muestras de alimentos inoculados con la bacteria.

Como se comentó anteriormente, el *S. aureus* puede producir distintos tipos de enterotoxinas capaces de ocasionar enfermedades, por lo que también se han desarrollado métodos para la determinación de las mismas. Un ejemplo de ello es el trabajo de Chen y col. [Chen, 2008], que determinaron la enterotoxina empleando un inmunosensor conductimétrico inmovilizando un anticuerpo contra esta toxina marcado con HRP sobre una superficie modificada con AuNPs, quitosan y MWCNTs. Por otra parte, Liu y col. [Liu, 2014] desarrollaron un sensor piezoeléctrico basado en la combinación de la técnica de la QCM con el desarrollo de un MIP sobre la superficie del cristal de cuarzo para la detección de los serotipos A y B de la enterotoxina estafilocócica en muestras de leche. Los LD alcanzados fueron de 7.97 y 2.25 ng mL⁻¹ para los serotipos A y B, respectivamente.

Po último, un ejemplo de aplicación de la determinación del *S. aureus* en el análisis clínico es el trabajo de Wiriyachaiporn y col, [Wiriyachaiporn, 2013], que diseñaron un formato de inmunoensayo con MAbs específicos de la pared celular de peptidoglicano del *S. aureus*, y lo acoplaron a un sistema de cromatografía de flujo lateral con detección colorimétrica, obteniendo una metodología sensible para la determinación de la bacteria (LD= 10^6 cfu mL⁻¹), que aplicaron al análisis de muestras respiratorias, demostrando su potencial aplicación como herramienta de diagnóstico de enfermedades relacionadas con el aparato respiratorio.

2.6. DETERMINACIÓN DE MARCADORES CARDIACOS. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Las **enfermedades cardiovasculares** (CVDs) engloban el conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos. Entre ellas se encuentran las enfermedades cerebrovasculares, las trombosis venosas profundas y embolias pulmonares, las vasculopatías periféricas, la insuficiencia cardíaca y las cardiopatías coronarias, reumáticas y congénitas.

El infarto agudo de miocardio (AMI) y los accidentes vasculares cerebrales (CVAs) suelen ser fenómenos agudos que se deben sobre todo a obstrucciones, fundamentalmente ocasionadas por la formación de depósitos de grasa en las paredes de los vasos que los irrigan, que impiden que la sangre fluya hacia el corazón o el cerebro, resultando normalmente en necrosis celular. Los CVAs también pueden deberse a hemorragias de los vasos cerebrales o coágulos de sangre.

Cuando se desarrolla una de dichas enfermedades, las células o el órgano pueden liberar proteínas específicas al sistema circulatorio, conocidas como **biomarcadores cardíacos** (CBs), pudiéndose utilizar sus niveles en sangre como marcadores para el diagnóstico clínico de este conjunto de enfermedades [Martín-Ventura, 2009]. El tipo de CB y su concentración, puede indicar el tipo de patología, el tiempo estimado desde que se inició el proceso o la ubicación de las células dañadas [Mohammed, 2011]. Hay varias características importantes que un CB ideal debería exhibir, entre las que se encuentran: una elevada sensibilidad y especificidad, una rápida liberación a la sangre para permitir un diagnóstico precoz, tener la capacidad de permanecer en sangre en un nivel elevado durante más tiempo y poder determinarse cuantitativamente. Es difícil seleccionar un único marcador para el diagnóstico de las CVAs, por lo que existe una amplia gama de CBs que pueden analizarse simultáneamente para dicho diagnóstico [McDonnell, 2009]. Los CBs más estudiados son los que tienen relación con los diferentes mecanismos involucrados en el desarrollo y la ruptura de la placa aterosclerótica, tales como disfunción endotelial, la inflamación, el estrés oxidativo, proteólisis, y trombosis. El primer marcador que se

libera tras producirse un daño en las células del miocardio es la mioglobina, pero no es un marcador muy específico. Sin embargo, el NT-proBNP, cTnT y la CRP, aunque se liberan después, son marcadores muy específicos de las enfermedades coronarias.

Los principales factores de riesgo para desarrollar una CVD son el consumo de tabaco, la falta de actividad física, una alimentación poco saludable y padecer algunas enfermedades como la obesidad o la diabetes. Muchos de estos factores son modificables, por lo que la prevención adquiere un papel muy importante para evitar su aparición. Las CVDs son la principal causa de muerte en todo el mundo [Qureshi, 2012], afectando por igual a ambos sexos, pero más del 80 % se producen en países de ingresos bajos y medios, probablemente debido a que están más expuestos a ciertos factores de riesgo y a que no suelen beneficiarse tanto de los programas de prevención ofrecidos por los sistemas sanitarios [Lim, 2012].

El diagnóstico precoz de CVDs es extremadamente importante, no sólo para la supervivencia de los pacientes sino también para el ahorro de costes y tiempo que se invierten en el pronóstico de las enfermedades. Los **métodos de diagnóstico de CVDs** existentes son fundamentalmente los métodos clásicos, basados en pruebas centralizadas en laboratorios que pueden tardar horas o días desde que se recibe una muestra hasta que se obtiene el resultado [Yang, 2006]. El diagnóstico de las CVDs se ha basado en los criterios de la OMS, según los cuales los pacientes deben cumplir al menos dos de las siguientes condiciones: tener dolor en el pecho, electrocardiograma de diagnóstico y elevación de los marcadores bioquímicos en sangre.

Un 50-70 % de los pacientes que ingresan por sospecha de padecer una CVDs muestran un electrocardiograma normal o ambiguo, por lo que el análisis de los CBs es crítico a la hora de dar el diagnóstico clínico y evaluar el tratamiento del paciente [Jaffe, 2006], por lo que resulta de gran interés el desarrollo de nuevas plataformas de medida más sensibles y rápidas. En este sentido, los biosensores aparecen como prometedoras alternativas de diagnóstico, ya que pueden resolver los problemas de sensibilidad, tiempo y coste [Mascini, 2008]. Recientemente, los biosensores basados en la tecnología “lab on a chip” (LOC), en dispositivos “point of care testing” (POCT) y

en sistemas de microfluídica se han consolidado como buenas estrategias para el diseño de dispositivos para el diagnóstico de CBs, ya que reúnen las ventajas de la miniaturización y la descentralización del proceso.

En los últimos años se ha desarrollado una gran variedad de sensores ópticos, piezoeléctricos, magnéticos y electroquímicos para la detección de marcadores de CVDs, debido a su potencial miniaturización, automatización, análisis de rutina y pruebas preliminares de diagnóstico.

Los marcadores cardiacos objeto de estudio en esta Tesis Doctoral han sido: la torponina T cardiaca (cTnT), el péptido natriurético cerebral N terminal (NT-proBNP), la proteína C reactiva (CRP) y la lipoproteína a (Lp(a)); todos ellos son CBs cuyos rangos de detección clínicamente significativos son muy bajos (desde niveles de pM a nM), por lo que para su determinación se precisan métodos de análisis muy sensibles. A continuación se describirán dichos CBs y se hará una revisión bibliográfica de los sensores desarrollados en los últimos años para su detección.

2.6.1. DETERMINACIÓN DE TROPONINA T CARDIACA

La **troponina** (cTn) es un complejo proteico globular de elevado peso molecular, que consta de 3 subunidades (I, T y C) (**Figura 8**) y es esencial para la regulación de la contracción del músculo cardiaco y esquelético [Moreira, 2011]. Las tres proteínas coexisten en diferentes isoformas: se ha descrito una específica con el tiempo para la cTnI, varias para la cTnT y ninguna para la cTnC.

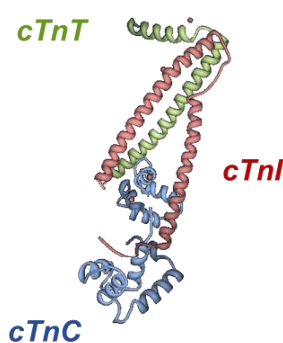


Figura 8. Complejo de troponina compuesto por las tres subunidades (I, T y C).

Las cTnI (23.5 KDa) y cTnT (37 KDa) están consideradas como los analitos estándar para el diagnóstico de AMI debido a sus elevadas sensibilidad y especificidad para detectar el daño de las células del miocardio [Silva, 2010]. Aunque no son CBs que se liberen rápidamente tras el proceso patológico, como es el caso de la mioglobina, sí son los más específicos y abarcan multitud de diagnósticos, de hecho, sus niveles en sangre permanecen anormales durante varios días después de la aparición de un AMI, existiendo una estrecha relación entre la concentración y la gravedad del infarto sufrido [Yang, 2006].

La nueva generación de pruebas para determinar cTn permite la detección de concentraciones más bajas con mayor precisión, pudiéndose detectar las elevaciones de los niveles en sangre unas 2 h después de la aparición de los síntomas [Wu, 2008]. La mayor sensibilidad de las pruebas permite otorgar un carácter pronóstico en muchos pacientes, cuyos niveles de cTn en sangre son ligeramente elevados debido a una lesión miocárdica “leve”, no siempre relacionada con una causa isquémica.

Con el paso del tiempo, el complejo de cTn se disocia en la sangre liberando cTnT y quedando por otro lado el complejo de las subunidades I/C. La existencia de múltiples formas de cTnI juntas, sumado a su baja estabilidad, dificultan el desarrollo de nuevas herramientas analíticas para su determinación.

La **cTnT** desempeña un papel muy importante en el diagnóstico de infarto agudo de miocardio. A las pocas horas de producirse el infarto, la cTnT es liberada al torrente sanguíneo, pudiendo permanecer a concentración elevada en sangre hasta 10 días después [Liu, 2011]. Los niveles de corte de cTnT en sangre están en el intervalo comprendido entre 0.05 y 0.1 ng mL⁻¹ [Qureshi, 2012]. Por lo tanto, el desarrollo de biosensores capaces de determinar este biomarcador en poco tiempo podría mejorar la atención al paciente, permitiendo un diagnóstico definitivo de AMI en tiempo real.

Los métodos empleados hasta el momento para la determinación de cTnT se han basado en ELISAs, radioinmunoensayos (RIAs), test inmunocromatográficos, inmunoensayos electroquimioluminiscentes y SPR [Moreira, 2011]. Aunque las

metodologías basadas en reacciones de inmutuafinidad se caracterizan por su selectividad, no tienen muy buena estabilidad, implican largos tiempos de análisis y costes elevados y requieren de personal especializado. Así, el desarrollo de nuevas herramientas que aprovechen la especificidad de los métodos inmutuquímicos tradicionales pero que a su vez minimicen las limitaciones impuestas por estas metodologías, resulta de gran interés. En este sentido, la investigación en el desarrollo de nuevos sensores de cTnT ha aumentado en los últimos años. A continuación se resumen algunos ejemplos de distintas estrategias implementadas en la creación de diversas plataformas sensoras para cTnT (**Tabla 6**).

Tabla 6. Biosensores para la determinación de cTnT.

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Inmunosensor basado en el empleo de SAMs para la inmovilización de Abs anti-cTnT mediante interacción Strp-biotin	SPR	Suero	0.03 – 6.5 ng mL ⁻¹ LD: 0.01 ng mL ⁻¹	[Dutra, 2007]
Inmunosensor basado en la medida del cambio de capacitancia producido por la interacción Ab-Ag	Capacitancia (electrodos planos de Al)	Suero	IL: 0.07 – 6.83 ng mL ⁻¹	[de Vasconcelos, 2009]
Inmunosensor tipo sándwich basado en el empleo de microesferas de Strp, Ab-biotin y SPEs	Amperometría (E _{app} = -0.7 V vs. Ag/AgCl) (H ₂ O ₂)	Suero	IL: 0.1 – 10 ng mL ⁻¹ LD: 0.2 ng mL ⁻¹	[Silva, 2010]
Inmunosensor basado en el empleo de SAMs mixtas (OEG/MHDA) sobre electrodos de oro	SPR	–	LD: 100 ng mL ⁻¹	[Liu, 2011]
Inmunosensor piezoeléctrico basado en el empleo de AuNPs inmovilizadas sobre una superficie electródica nanoestructurada	QCM	Suero	IL: 0.003 – 0.5 ng mL ⁻¹ LD: 0.0015 ng mL ⁻¹	[Fonseca, 2011]
Sensor basado en el depósito de cTnT mediante MI sobre la superficie de MWCNTs	Potenciometría (electrodo de alambre de Au)	Suero	IL: 1.41 – 20.86 µg mL ⁻¹ LD: 0.16 µg mL ⁻¹	[Moreira, 2011]
Inmunosensor directo basado en el empleo de CNTs y SPEs	DPV (+0.25 V vs. Ag/AgCl)	Suero	IL: 0.0025 – 0.5 ng mL ⁻¹ LD: 0.0035 ng mL ⁻¹	[Silva, 2013]
Inmunosensor basado en la nanoestructuración de un AuE con CNTs	CV	Suero	IL: 0.1 – 10 ng mL ⁻¹ LD: 0.033 ng mL ⁻¹	[Gomes-Filho, 2013]
Inmunosensor enzimático basado en la inmovilización covalente de los Abs sobre un GCE mediante el empleo de un derivado de polianilina	Cronoamperometría (-0.05 V) (H ₂ O ₂)	Suero	IL: 0.05 – 5 ng mL ⁻¹ LD: 0.088 ng mL ⁻¹	[Mattos, 2013]

Tabla 6. Biosensores para la determinación de cTnT (Continuación).

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Sensor basado en el empleo de MIPs formados por electropolimerización con o-fenilendiamina	DPV ([Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻)	Suero	IL: 0.009 – 0.8 ng mL ⁻¹ LD: 9 pg mL ⁻¹	[Karimian, 2013]

Abreviaturas utilizadas: **Abs:** anticuerpos; **Ag:** antígeno; **AuE:** electrodo de oro; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **biotin:** biotina; **CNTs:** nanotubos de carbono; **cTnT:** troponina cardiaca T; **CV:** voltamperometría cíclica; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **GCE:** electrodo de carbono vitrificado; **IL:** intervalo lineal; **LD:** límite de detección; **MBs:** partículas magnéticas; **MHDA:** ácido mercaptohexadecanoico; **MI:** impresión molecular; **MIP:** polímero de impresión molecular; **MWCNTs:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **OEG:** oligo-etilenglicol; **QCM:** microbalanza de cristal de cuarzo; **SAMs:** monocapas autoensambladas; **SPEs:** electrodos serigrafiados; **SPR:** resonancia de plasmón superficial; **Strp:** estreptavidina.

En el inmunosensor de cTnT desarrollado por de Vasconcelos y col. [de Vasconcelos, 2009], el principio de detección se basaba en los cambios de capacitancia que se producían entre dos electrodos planos de aluminio tras la interacción Ab-Ag. Mediante esta estrategia fueron capaces de trabajar en un amplio intervalo de concentraciones de cTnT ($0.07\text{--}6.83\text{ ng mL}^{-1}$) en suero humano.

Otra estrategia de determinación de cTnT [Silva, 2010] combinaba las ventajas del empleo de SPEs con la estabilidad de la interacción entre la Strp y la biotina para el desarrollo de un inmunosensor amperométrico de tipo sándwich. La incorporación de partículas recubiertas de Strp aportó estabilidad al sistema y permitió mejorar considerablemente la sensibilidad, consiguiendo un LD de 0.2 ng mL^{-1} .

Por otra parte, Fonseca y col. [Fonseca, 2011] inmovilizaron AuNPs sobre una superficie electródica, previamente modificada con grupos ditiol, para la inmovilización covalente de los anti-cTnT. La nanoestructuración de la superficie electródica permitió una mejor y más estable inmovilización de los biomateriales, así como un aumento de la superficie activa del sensor, que se tradujo en una mejora de la sensibilidad, lográndose alcanzar un LD de 0.0015 ng mL^{-1} , y demostrando su aplicabilidad potencial para el análisis de muestras clínicas.

Moreira y col. [Moreira, 2011] sintetizaron un nuevo anticuerpo artificial depositando la cTnT mediante impresión molecular sobre la superficie de MWCNTs, y permitiendo así la detección específica del antígeno. Las membranas sensoras sintetizadas se emplearon para recubrir distintas superficies conductoras (representadas por alambres de distintos metales), utilizándose la potenciometría como técnica de detección. Mediante el empleo de un alambre de oro recubierto de la membrana molde sintetizada se obtuvo un LD de $0.16\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

Las ventajas electroquímicas de los CNTs y SPEs se emplearon, una vez más, para el diseño de un inmunosensor desechable para la detección de cTnT [Silva, 2013]. Las interacciones Ab-Ag producidas sobre la superficie electródica se controlaron por DPV, registrando las diferencias entre las corrientes de pico obtenidas en presencia y

ausencia de biomarcador. La metodología desarrollada permitió una detección rápida de cTnT con una elevada sensibilidad y bajo LD ($0.0035 \text{ ng mL}^{-1}$).

Karimian y col. [Karimian, 2013] describieron un sensor electroquímico basado en el empleo de MIPs para el reconocimiento selectivo de cTnT. El MIP fue preparado por electropolimerización de o-fenilendiamina sobre un electrodo de oro y depositando el antígeno como molde. La detección electroquímica por DPV se llevó a cabo empleando el par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como sistema modelo.

Por último, destacar el trabajo de Mattos y col. [Mattos, 2013], que diseñaron una estrategia de inmovilización covalente de los anti-cTnT basada en el empleo de una superficie con grupos carboxilo. Para la obtención de dicha superficie se electropolimerizó con ácido o-aminobenzoico la superficie de un electrodo de carbono vitrificado (GCE), permitiendo de esta forma la inmovilización covalente de los Abs a través de sus regiones amino reactivas a la superficie del electrodo. La detección cronoamperométrica se llevó a cabo mediante el empleo de HRP y H_2O_2 . La funcionalización del electrodo con la película del derivado de polianilina permitió la inmovilización de proteínas y promovió una transferencia electrónica eficiente.

2.6.2. DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL AMINO TERMINAL.

La familia de los **péptidos natriuréticos** consta de tres péptidos: el péptido natriurético auricular (ANP), el péptido natriurético cerebral, o tipo B (BNP), y el péptido natriurético tipo C (CNP). Son neurohormonas que están relacionadas con la respuesta al estrés hemodinámico y están implicadas en la regulación de la homeostasis del volumen intravascular.

Tras una insuficiencia cardiaca, la molécula precursora proBNP es secretada al torrente sanguíneo, produciéndose su escisión a BNP (fragmentos C-terminal, 3.4 KDa) y al péptido natriurético cerebral N terminal (NT-proBNP, 8.5 KDa) (**Figura 9**), [Troughton, 2009].

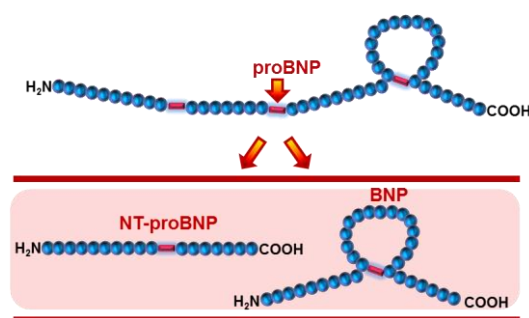


Figura 9. Esquema de la escisión de la molécula proBNP a NT-proBNP y BNP.

El **NT-proBNP** tiene una vida media más larga, es un marcador muy específico para el diagnóstico o para la exclusión de insuficiencia cardiaca aguda, refleja la expansión del volumen ventricular, sobrecarga ventricular y el grado de lesión cardiaca [Yi, 2011]. La elevación de sus concentraciones plasmáticas proporciona información diagnóstica importante de fallo cardiaco con una elevada sensibilidad y también se puede utilizar para evaluar el grado de disfunción cardíaca grave [Yang, 2006]. Los niveles de corte de NT-proBNP están en el intervalo comprendido entre 0.25 y 2 ng mL⁻¹. Además, se ha demostrado que también es un marcador útil para diagnóstico de rechazo de trasplante de corazón, habiéndose establecido el valor potencial de corte en 1.0 ng mL⁻¹ de NT-proBNP para la clasificación de pacientes con riesgo de muerte al año del trasplante [Avello, 2010]. Demostrado su importante valor en el diagnóstico y pronóstico de enfermedades cardiacas, el NT-proBNP ha sido recomendado como un marcador principal en suero para el diagnóstico de insuficiencia cardiaca.

Aunque existen varios métodos comerciales para su determinación basados en ELISAs y en técnicas de quimioluminiscencia, son métodos que tienen ciertas limitaciones asociadas, como el elevado coste por ensayo, procedimientos complicados de lavado y de preparación de la muestra, largos tiempos de detección y difícil automatización y miniaturización. En este sentido, los biosensores aparecen una vez más como herramientas alternativas para su determinación, ofreciendo las ventajas de fácil manipulación, robustez, rapidez y posibilidad de detección multianalito [Al-Khafaji, 2012]. En la **Tabla 7** se recogen algunos ejemplos de biosensores para la determinación de NT-proBNP.

Tabla 7. Biosensores para la determinación de NT-proBNP.

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Inmunosensor basado en la modificación de la superficie sensora con una complejo de poli-estirenosulfonato y poli-L-lisina	SPR	–	LD: ~1 nM	[Kurita, 2008]
Inmunoensayo enzimático de tipo sándwich basado en el empleo de AuNPs y CNTs	CV (HQ/H ₂ O ₂)	–	IL: 0.02 – 100 ng mL ⁻¹ LD: 6 pg mL ⁻¹	[Zhuo, 2011]
Magnetoinmunosensor directo y regenerable basado en el empleo de MAbs	Amperometría	Suero	IL: 0.04 – 2.5 ng mL ⁻¹ LD: 0.03 ng mL ⁻¹	[Yi, 2011]
Plataforma sensora basada en un inmunoensayo de tipo sándwich y liposomas de cocaína con Abs inmovilizados en la superficie	ECL (Ru(bpy) ₃ ²⁺)	–	IL: 0.01 – 500 ng mL ⁻¹ LD: 0.77 pg mL ⁻¹	[Mao, 2011]
Inmunosensor de tipo sándwich basado en el empleo de avidina-MBs y Ab-biotin	Amperometría (E _{app} = 0.1 V) (H ₂ O ₂ -PB)	Suero	IL: 1.67 – 2.5 ng mL ⁻¹ LD: 0.003 ng mL ⁻¹	[Liang, 2012]
Inmunosensor ECL basado en el empleo de Fc-CsNPs	ECL	–	IL: 0.001 – 2 pg mL ⁻¹ LD: 0.33 fg mL ⁻¹	[Zhuo, 2014]

Abreviaturas utilizadas: **Abs:** anticuerpos; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **Biotin:** biotina; **CNTs:** nanotubos de carbono; **CV:** voltamperometría cíclica; **ECL:** electroquimioluminiscencia; **Fc-CsNPs:** nanopartículas de quitosán y ferroceno; **HQ:** hidroquinona; **IL:** intervalo lineal; **LD:** límite de detección; **MAbs:** anticuerpos monoclonales; **MBs:** partículas magnéticas; **PB:** azul de Prusia; **SPR:** resonancia de plasmón superficial.

En cuanto a la determinación de NT-proBNP, Zhuo y col. [Zhuo, 2011] describieron una nueva metodología basada en el empleo de un material nanoestructurado con AuNPs y CNTs como plataforma para la inmovilización de los anticuerpos de captura. Para completar el formato de tipo sándwich, emplearon un anticuerpo secundario conjugado con nanocadenas de oro y HRP, lo que permitió amplificar la señal electroquímica obtenida. El NT-proBNP pudo detectarse muy por debajo de los niveles séricos normalmente encontrados en suero humano.

Yi y col. [Yi, 2011] emplearon MBs modificadas con avidina para desarrollar un novedoso sistema de inmunosensor electroquímico directo basado en el empleo de MAbs biotinilados específicos para NT-proBNP. Mediante un simple lavado se podía regenerar la superficie sensora, permitiendo realizar varios análisis con el mismo electrodo.

Mao y col. [Mao, 2011] describieron una estrategia novedosa de inmunoensayo con detección ECL para la detección de NT-proBNP, empleando pequeñas moléculas de cocaína encapsuladas en liposomas, que actuaban como marcadores del anticuerpo secundario. La medida de la concentración de NT-proBNP se fundamentaba en los cambios de la señal de ECL causados por la liberación de las moléculas contenidas en el liposoma. La cocaína fue elegida como molécula modelo, ya que amplificaba la señal de ECL del $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$.

Por otra parte, se ha desarrollado un inmunosensor electroquimioluminiscente (ECL) basado en el empleo de nanopartículas de quitosano funcionalizadas con ferroceno utilizadas como marcador de un anticuerpo secundario [Zhuo, 2014]. La detección de la formación del inmunoconjugado (basado en un formato tipo sándwich), se traducía en una notable disminución de la señal de ECL, es decir, se obtenían señales menores a medida que aumentaba la concentración de NT-proBNP.

2.6.3. DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA

La **proteína C reactiva** (CRP, 110-140 kDa), producida por el hígado y los adipocitos, es una α -globulina que pertenece a la familia de proteínas conocidas como pentraxinas. Está formada por cinco monómeros idénticos de 25 kDa ensamblados de forma no covalente dando lugar a un disco pentamérico anular [Vermeeren, 2011], (Figura 10). La presencia de concentraciones elevadas de CRP en sangre siempre ha sido sinónimo de la existencia de una reacción de fase aguda, es decir, de un proceso inflamatorio [Gómez, 2006]. Es un indicador de infección e inflamación, y ha sido el biomarcador más utilizado para determinar el riesgo cardiovascular (CVR) y el síndrome de enfermedad coronaria aguda (ACS). Tras un proceso inflamatorio, la CRP puede aumentar hasta 10^3 veces [Mohammed, 2011], [Anderson, 2005], incrementándose los niveles normales en 6 h y llegando al máximo en 48 h.

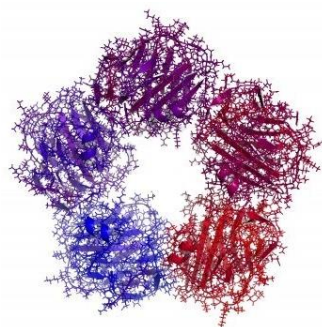


Figura 10. Estructura pentamérica de la proteína C reactiva (CRP).

El riesgo cardiovascular ha sido definido por varias asociaciones, como la Asociación Americana del Corazón (American Heart Association, AHA) y los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), de los Estados Unidos, considerando de bajo riesgo concentraciones de CRP inferiores a 1.0 mg L^{-1} , riesgo moderado para concentraciones comprendidas entre 1.0 y 3.0 mg L^{-1} , y de alto riesgo concentraciones superiores a 3.0 mg L^{-1} [Yang, 2009^b], [Lee, 2011]. Las últimas investigaciones sugieren que los pacientes con niveles basales elevados de CRP tienen un mayor riesgo de padecer hipertensión, diabetes y enfermedades cardiovasculares.

Hoy en día, hay varias pruebas disponibles para la determinación de CRP basadas en tecnologías nefelométricas y turbidimétricas [Roberts, 2000], [Roberts, 2001], ELISAs [Macy, 1997] y técnicas de inmunodifusión rápida. Pero, en general, todas estas técnicas presentan una baja sensibilidad, requieren de un elevado tiempo de análisis y no pueden aplicarse a rápidos diseños de dispositivos POCT. Otros métodos rutinarios empleados en los laboratorios clínicos suelen cuantificar entre 3-8 mg L⁻¹ de CRP, por lo que, en los últimos años se han invertido muchos esfuerzos en el diseño de nuevos dispositivos más sensibles para su análisis, destacando una vez más varias plataformas sensoras descritas en la bibliografía (Tabla 8).

Tabla 8. Biosensores para la determinación de CRP.

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Estrategia de análisis de CRP mediante el empleo de MABs orientados sobre la superficie sensora	SPR	Suero	IL: $1 - 5 \times 10^4$ ng mL ⁻¹ (PBS) IL: $4 - 5 \times 10^4$ ng mL ⁻¹ (Suero)	[Vikholm-Lundin, 2006]
Inmunosensor de fibra óptica	Fluorescencia	—	IL: $5 - 12.5 \times 10^3$ ng mL ⁻¹	[Chou, 2007]
Inmunoensayo directo de tipo competitivo basado en el empleo de un MR marcado	Fluorescencia	Suero	LD: 0.1 ng mL ⁻¹	[Jung, 2009]
Ensayo tipo sándwich con MBs y CNTs sobre SPCEs	DPV (naftilfosfato)	Suero	LD: 5.4×10^{-11} ng mL ⁻¹	[Centi, 2009]
Inmunoensayo tipo sándwich basado en la inmovilización de MABs específicos de CRP sobre un polímero de PDMS	ECL	Suero	LD: 12.5 µg L ⁻¹	[Heyries, 2009]
Inmunoensayo tipo sándwich basado en el empleo de MBs y QDs-Strp	Fluorescencia	Suero	LD: 0.5 fM	[Zhu, 2010]
Inmunoensayo basado en el empleo de Abs y MBs modificadas con aptámeros específicos acoplado en un chip integrado en un sistema de microfluídica	ECL	Suero	IL: 0.0125 – 10 mg L ⁻¹ LD: 0.0125 mh L ⁻¹	[Lee, 2011]
Sistema de análisis de CRP basado en MIPs (AEDP y DMAA) con MWCNTs	DPV ([Fe(CN) ₆] ³⁻ /[Fe(CN) ₆] ⁴⁻)	Suero	IL: 0.18 – 8.5 µg mL ⁻¹ LD: 0.04 µg mL ⁻¹	[Kumar, 2012]
Inmunosensor basado en la inmovilización de los Abs sobre nanotubos de ZnO	Potenciometría	Plasma	IL: $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^0$ mg L ⁻¹ LD: 1×10^{-6} mg L ⁻¹	[Ibupoto, 2012]
Inmunosensor basado en el empleo de MBs y SPCEs modificados	Amperometría (E _{app} = -50 mV) (H ₂ O ₂)	Suero	IL: 1.2 – 200 ng mL ⁻¹ LD: 0.5 ng mL ⁻¹	[Gan, 2012]
Inmunosensor impedimétrico basado en la modificación de la superficie electródica con SAMs	EIS	Suero	IL: 0.5 – 50 nM LD: 176 pM	[Bryan, 2013]

Tabla 8. Biosensores para la determinación de CRP (Continuación).

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Inmunosensor tipo sándwich basado en el empleo de Abs conjugados con AuNPs	QCM	Suero	IL: 20 ng mL^{-1} – $30 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ LD: $0.02 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	[Ding, 2013]
Inmunosensor directo basado en la inmovilización de Abs sobre MWCNTs	Campo eléctrico (FET)	–	IL: 10^{-4} – $10^{-2} \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ LD: $10^{-4} \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	[Justino, 2013]

Abreviaturas utilizadas: **Abs:** anticuerpos; **AEDP:** amino-2-etil-1,3-propanodiol; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **CNTs:** nanotubos de carbono; **CRP:** proteína C reactiva; **DMAA:** N-(4-dimetilaminofenil)-acrilamida; **DPV:** voltamperometría diferencial de impulsos; **ECL:** electroquimioluminiscencia; **EIS:** espectroscopia de impedancia electroquímica; **FET:** transistor de efecto campo; **IL:** intervalo lineal; **LD:** límite de detección; **MAbs:** anticuerpos monoclonales; **MBs:** partículas magnéticas; **MIPs:** polímeros de impresión molecular; **MR:** material de referencia; **MWCNT:** nanotubos de carbono de pared múltiple; **PBS:** disolución reguladora de fosfato; **PDMS:** polidimetilsiloxano; **QDs:** quantum dots (puntos cuánticos); **QCM:** microbalanza de cristal de cuarzo; **SAMs:** monocapas autoensambladas; **SPCEs:** electrodos serigrafiados de carbono; **SPR:** resonancia de plasmón superficial; **Strp:** estreptavidina.

Las MBs también se han empleado en la fabricación de sensores de CRP. Éste es el caso del trabajo de Lee y col. [Lee, 2011] que diseñaron un sistema de microfluídica en el que integraron un inmunoconjugado basado en el empleo de MBs modificadas con aptámeros específicos de CRP y anticuerpos específicos marcados con acridinio, lo que permitía la medida posterior por electroquimioluminiscencia. El sistema tenía las ventajas de estar totalmente automatizado, consumir pequeños volúmenes de muestra y permitir un análisis rápido de CRP en muestras de suero.

Kumar y col. [Kumar, 2012] sintetizaron un nuevo MIP con varios sitios de reconocimiento de la molécula de CRP. La fabricación se basó en la incorporación de amino-2-etil-1,3-propanodiol (AEDP), que actuaba como agente de cohesión natural de la fosfatidilcolina. De esta manera, el grupo fosfato del AEDP interactuaba con los iones Ca^{2+} de la CRP con una elevada afinidad. Se empleó un segundo monómero, el N-(4-dimetilaminofenil)-acrilamida (DMAA), para interactuar de forma no covalente a través de su nitrógeno cargado positivamente con los aminoácidos cargados negativamente asociados a las moléculas de CRP. Estos dos monómeros otorgaron una gran capacidad de cohesión para la CRP, resultando una plataforma de inmovilización muy específica. Tras eliminar la plantilla con un disolvente de extracción, se formó un MIP con varias zonas de reconocimiento que se creció sobre la superficie de SPCEs también modificada con MWCNTs para mejorar la sensibilidad de la detección electroquímica. La medida electroquímica se realizó por DPV utilizando el sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ como especie electroactiva para la detección indirecta de CRP. La extracción de la CRP dio lugar a zonas biomiméticas en la superficie del electrodo que actuaban como canales permitiendo el acceso del ferrocianuro por difusión dentro y fuera de la red polimérica. El LD alcanzado fue de $0.04 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Gan y col. [Gan, 2012] desarrollaron un inmunosensor reutilizable basado en el empleo de partículas metálicas de oro con propiedades magnéticas y SPCEs. Las nanopartículas funcionalizadas con un anti-CRP-HRP se depositaron sobre la superficie de los SPCEs, que había sido previamente modificada con una membrana de quitosán y ftalocianina de Fe(III). Tras una incubación con el antígeno, el acceso al centro activo de la HRP se inhibía parcialmente, produciéndose una disminución de la eficiencia

catalítica de la enzima, debido a la reducción de la ftalocianina inmovilizada sobre la superficie electródica. El inmunosensor se aplicó al análisis de muestras de suero de pacientes reales, comparándose los resultados obtenidos con un kit ELISA comercial.

También se han descrito inmunosensores piezoeléctricos para la determinación de CRP; tal es el caso del trabajo de Ding y col. [Ding, 2013], que describieron un inmunoensayo de tipo sándwich para el análisis cuantitativo de CRP mediante QCM, y además mejoraron la sensibilidad de la determinación mediante el empleo de AuNPs conjugadas con los anticuerpos empleados. Con esta metodología alcanzaron un LD de $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$ y demostraron su potencial aplicación al análisis de muestras reales mediante el análisis de un suero contaminado.

Por último, dentro del conjunto de inmunosensores electroquímicos descritos para este biomarcador cardíaco, Bryan y col. [Bryan, 2013] desarrollaron un inmunosensor impedimétrico basado en la inmovilización controlada de los anticuerpos sobre la superficie de un electrodo de disco de oro. La novedad de dicha metodología residía en el amplio rango de concentraciones de CRP presente en muestras de suero humano que podía determinarse (0.5–50 nM) y en el carácter reutilizable del sensor, cuya superficie podía regenerarse con una simple inmersión en NaOH 6 mM y etanol al 0.6 %.

2.6.4. DETERMINACIÓN DE LA LIPOPROTEÍNA A

Las lipoproteínas son moléculas constituidas por proteínas y grasa que transportan el colesterol y sustancias similares a través de la sangre. La **lipoproteína-a** (Lp(a)) (**Figura 11**), es una lipoproteína plasmática constituida por la asociación de una partícula de lipoproteínas de baja densidad (LDL) rica en colesterol y una molécula adicional de apolipoproteína-a (Apo(a)), parecida al plasminógeno, que está unida covalentemente a la apolipoproteína B100 (ApoB100) por medio de enlaces disulfuro [Nordestgaard, 2010]. Un tercio está formado por proteínas, otro tercio por lípidos y el resto por derivados hidrocarbonados. La fracción proteica o Apo(a) es de peso molecular variable (entre 400 a 800 kDa) y está formada por un número variable de

aminoácidos (entre 3600 a 7200), terminando en un dominio serin-proteasa que constituye la parte homóloga al plasminógeno. Debido a su homología con el plasminógeno, la Lp(a) compite por los sitios de unión en la molécula y las células, y puede interferir con la fibrinólisis y acentuar el riesgo trombótico [Champman, 1994].

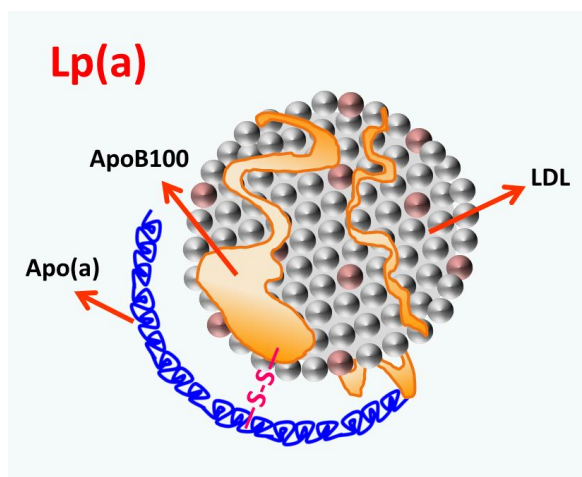


Figura 11. Esquema de la estructura química de la molécula de lipoproteína a (Lp(a)).

La Lp(a) es un CB que está considerado un factor de riesgo de cardiopatía [Clarke, 2009] y es un nuevo factor de riesgo independiente para la enfermedad de la arteria coronaria, especialmente en los hombres de raza blanca e hipercolesterolémicos [Walldius, 2004]. Esta lipoproteína es también un factor genético que constituye un mayor riesgo de sufrir arteriosclerosis [Tsimikas, 2012]. Sus concentraciones plasmáticas están fuertemente condicionadas por factores genéticos, y permanecen bastante estables y con valores característicos a lo largo de la vida, aunque pueden variar en distintas situaciones fisiológicas y patológicas. Entre los adultos ancianos, un nivel elevado de Lp(a) es un factor predictivo de accidente cerebrovascular o accidente isquémico transitorio y de muerte por enfermedad vascular en hombres, datos que respaldan el uso de la concentración de Lp(a) en la predicción del riesgo de tales eventos en los varones ancianos.

La determinación de los valores plasmáticos de Lp(a) no constituye una práctica clínica generalizada, a pesar de que los análisis de Lp(a) son muy útiles en la evaluación

de pacientes con enfermedad de la arteria coronaria establecida, con una historia familiar de enfermedad cardíaca coronaria prematura, con elevaciones de colesterol LDL y dos o más factores de riesgo, y con aquellos que hayan tenido una angioplastia coronaria.

El efecto aterotrombogénico de la Lp(a) depende de que su concentración plasmática sea elevada. Además, las concentraciones elevadas de Lp(a) plasmática están estrechamente correlacionadas con un mayor riesgo de infarto miocárdico y cerebral. Niveles de Lp(a) inferiores a 20 mg dL⁻¹ se consideran normales, aumentando en dos veces el riesgo relativo para el desarrollo de enfermedad aterosclerótica si superan los 30 mg dL⁻¹.

Actualmente existen varios dispositivos comerciales para determinación de Lp(a) (**Tabla 9**), siendo los más importantes un conjunto de enzimoimmunoensayos, como ELISAs, inmunoensayos de aglutinación en látex, análisis inmunofelométricos e immunoturbidimétricos y análisis de fluorescencia [**Marcovina, 2003**]. Estos métodos presentan las limitaciones que se han comentado anteriormente, fundamentalmente referidas a sensibilidad, rapidez y capacidad de miniaturización y automatización, por lo que nuevamente los biosensores se presentan como herramientas alternativas interesantes. Apenas se han encontrado ejemplos descritos en la bibliografía de plataformas sensoras para Lp(a), por lo que el inmunosensor desarrollado en esta Tesis Doctoral resultaría de gran relevancia para su potencial aplicación en el análisis clínico.

Tabla 9. Dispositivos para la determinación de Lp(a).

Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
Inmunoensayo de aglutinación en látex basado en Abs marcados con HRP	Colorimétrico	Plasma	IL: $\sim 1 - 140 \text{ mg dL}^{-1}$	[Gaw, 1997]
Comparación de un inmunoensayo visual y de un ELISA tipo sándwich comercial	Colorimétrico	Suero	–	[Torres, 1998]
Método Tina-quant [®] , basado en el empleo de anti-Lp(a). La cantidad de complejo Ab-Ag es directamente proporcional al contenido de Lp(a)	Turbidimetría	Suero	LD: 32.5 mg L^{-1}	[Ordóñez, 1999]
ELISA tipo sándwich basado en el empleo de HAbs para la detección de Lp(a)-ox	Colorimétrico	Plasma	DR: $0 - 1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	[Wang, 2007]
Empleo de Abs específicos	Inmunoturbidimetría	Suero	–	[Gómez, 2009]
ELISAs basados en el empleo de Abs anti-Lp(a) oxidada. ELISA(1) con HAbs para la detección de Lp(a)-ox y ELISA(2) con PAbs para la detección de ApoB100-ox	Colorimétrico	Plasma	–	[Wang, 2010 ^b]
Método basado en la combinación de UC y HPLC	Medidas de densidad	Suero	LD: $0.065 \text{ mmol L}^{-1}$	[Dong, 2012]

Abreviaturas utilizadas: **Ab-Ag:** complejo antígeno-anticuerpo; **Abs:** anticuerpos; **ApoB100-ox:** apolipoproteína B100 oxidada; **DR:** rango dinámico; **ELISA:** ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas; **HAbs:** anticuerpos humanos; **HPLC:** cromatografía líquida de alta eficacia; **HRP:** peroxidasa de rábano; **IL:** intervalo lineal; **LD:** límite de detección; **Lp(a)-ox:** lipoproteína a oxidada; **PAbs:** anticuerpos policlonales; **UC:** ultracentrifugación.

2.6.5. DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MARCADORES CARDIACOS

Como ha quedado reflejado, un aumento en la concentración séricas de los biomarcadores cardíacos se asocia con la aparición de distintas CVDs y con elevadas tasas de mortalidad, por lo que el análisis de estos biomarcadores adquiere una gran importancia en el ámbito del diagnóstico clínico. Los métodos actualmente utilizados con este fin requieren de múltiples pasos, grandes cantidades de muestra y largos tiempos. Por ello, ha aumentado la demanda de desarrollo de ensayos que proporcionen una detección sensible, específica, rápida y automatizada de varios analitos a la vez en muestras clínicas, lo que permitiría dar al paciente resultados de diagnóstico más precisos en menor tiempo [Lai, 2011]. Por ejemplo, el análisis simultáneo de NT-proBNP y cTn puede servir para una mejor identificación de pacientes con alto riesgo de insuficiencia cardíaca, ya que se observó una mayor tasa de mortalidad en pacientes con insuficiencia cardíaca aguda cuando ambos marcadores estaban en sangre en concentraciones elevadas.

Sin embargo, en la bibliografía hay escasos ejemplos de biosensores para multidetección de biomarcadores de enfermedades cardíacas. Las metodologías descritas hasta el momento se basan fundamentalmente en sistemas de microfluídica que precisan pequeños volúmenes de muestra y reactivos, así como en sistemas de análisis POCT, que permiten dar resultados rápidos de muestras complejas tales como la sangre humana.

A continuación se realizará una breve descripción de biosensores descritos en la bibliografía para la determinación simultánea de distintos biomarcadores cardíacos (Tabla 10).

Tabla 10. Biosensores para la determinación simultánea de marcadores cardiacos.

Biomarcadores	Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
CRP, cTnI y mioglobina	Inmunoensayo acoplado a un sistema de microfluídica	Fluorescencia	Plasma	LD: $\sim 0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CRP)	[Wolf, 2004]
MB, cTn y CK-MB	Inmunoensayo de tipo sándwich sobre SPE de grafito	CV	–	–	[Piras, 2005]
CRP, TNF_α , proteína amiloide A sérica y HFABP	Inmunosensor óptico tipo sándwich basado en un microarray	Fluorescencia	Suero	DR: $2.2 - 531 \text{ ng mL}^{-1}$ (CRP), $5.9 - 1434 \text{ ng mL}^{-1}$ (TNF_α) y $5.9 - 478 \text{ ng mL}^{-1}$ (proteína amiloide A sérica)	[Gul, 2007]
CRP, IL6 y PCT	Inmunosensor óptico tipo sándwich basado en el empleo de un chip integrado en un sistema de microfluídica	TIRF (Fluorescencia)	Plasma	LD: 0.35 ng mL^{-1} (CRP), 0.08 ng mL^{-1} (IL6) y 1.01 ng mL^{-1} (PCT)	[Kemmler, 2009]
CRP, IL6 y TNF_α	Inmunosensor directo basado en la inmovilización de Abs sobre un array de GIE	Capacitancia (variación de campo eléctrico)	–	IL: $25 \text{ pg mL}^{-1} - 25 \text{ ng mL}^{-1}$ LD: 32 pg mL^{-1}	[Qureshi, 2010]
cTnI y CRP	Inmunosensor electroquímico basado en el empleo de una célula de PDMS-AuNPs y en el marcaje de los Abs con QDs	SWASV	Suero	IL: $0.01 - 50 \mu\text{g L}^{-1}$ (cTnI) y $0.5 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$ (CRP) LD: 5 amol (cTnI) y 307 amol (CRP)	[Zhou, 2010]
cTnT, CK-MM y CK-MB	Cambios de resistencia producidos sobre SiNW tras la reacción inmunológica	Medidas de resistencia	Sangre	IL: $1 \text{ pg mL}^{-1} - 10 \text{ ng mL}^{-1}$ LD: 1 pg mL^{-1}	[Zhang, 2011]
CRP, TNF_α y PCT	Inmunosensor óptico tipo sándwich basado en la inmovilización de los Abs sobre la superficie de un chip de PMMA	TIRF (Fluorescencia)	Suero	LD: 1.265 mg mL^{-1} (CRP), 10 ng mL^{-1} (TNF_α) y 50 ng mL^{-1} (PCT)	[Krämer, 2011]
cTnT, CK-MM y CK-MB	Sistema de detección sin marcaje basado en una serie de SiNWs y una interfaz de lectura ASIC	Medidas de resistencia	Suero	LD: 100 fg mL^{-1}	[Zhang, 2012]

Tabla 10. Biosensores para la determinación simultánea de marcadores cardíacos (Continuación).

Biomarcadores	Metodología	Técnica-Detección	Muestra	Características analíticas	Referencia
cTnI y HFABP	Inmunosensor basado en el empleo de Abs de captura inmovilizados sobre GONRs y nanoesferas de TiP funcionalizadas con iones metálicos empleados como marcadores	SWV	Suero	IL: $0.05 \text{ pg mL}^{-1} - 50 \text{ ng mL}^{-1}$ LD: 1 fg mL^{-1} (cTnI) y 3 fg mL^{-1} (HFABP)	[Feng, 2012]

Abreviaturas utilizadas: **Abs:** anticuerpos; **ASIC:** circuito integrado para aplicaciones específicas; **AuNPs:** nanopartículas de oro; **CK:** creatina quinasa; **CRP:** proteína C reactiva; **cTn:** complejo de troponina cardíaca; **cTnI:** troponina cardíaca I; **cTnT:** troponina T cardíaca; **CV:** voltamperometría cíclica; **DR:** rango dinámico; **GIE:** electrodos interdigitados de oro; **GONRs:** nanocintas de grafeno; **HFABP:** proteína transportadora de ácidos grasos; **IL:** intervalo lineal; **IL6:** interleucina 6; **LD:** límite de detección; **PCT:** procalcitonina; **PDMS:** polidimetilsiloxano; **PMMA:** polimetilmetacrilato; **QDs:** quantum dots (puntos cuánticos); **SiNWs:** nanoalambres de silicio; **SPE:** electrodo serigrafiado; **SWV:** voltamperometría de onda cuadrada; **SWASV:** voltamperometría de redisolución por onda cuadrada; **TiP:** fosfato de titanio; **TIRF:** fluorescencia de reflexión interna total; **TNF α :** factor de necrosis tumoral α .

Qureshi y col. [Qureshi, 2010] desarrollaron un inmunosensor de capacitancia directo basado en un array de electrodos de oro interdigitados para determinar CRP, interleucina 6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral α (TNF $_{\alpha}$). Estudiaron dos formatos diferentes; en uno de ellos se inmovilizaron Abs específicos de cada biomarcador sobre la superficie de diferentes electrodos, lo que permitió la detección de IL6 y CRP en el rango de 25 pg mL⁻¹ a 25 ng mL⁻¹, y de TNF $_{\alpha}$ de 25 pg mL⁻¹ a 1 ng mL⁻¹. En un segundo formato se inmovilizaron cantidades equivalentes de todos los Abs sobre cada electrodo, lo que permitió un análisis simultáneo de los tres CBs, detectándose todos en el rango de 25 pg mL⁻¹ a 25 ng mL⁻¹.

Zhou y col. [Zhou, 2010] inmovilizaron Abs específicos de cTnI y CRP sobre unos microreactores de polidimetilsiloxano (PDMS) y AuNPs y, posteriormente, realizaron un marcaje de los Abs secundarios con QDs. La detección simultánea de ambos analitos se realizó mediante la medida electroquímica de los correspondientes metales tras producirse la redisolución anódica de los QDs empleados. La metodología descrita permitió alcanzar bajos LD para ambos analitos (5 amol para cTnI y 307 amol para CRP), además de mostrar una buena selectividad.

Zhang y col. [Zhang, 2011] describieron otra plataforma de multidetección para cTnT, creatina quinasa MB (CK-MB) y MM (CK-MM) en sangre. El sistema de detección estaba formado por un sensor compuesto por un array de nanoalambres de silicio (SiNW), en los que se inmovilizaban Abs específicos de los CBs. Las medidas se basaban en el registro de los cambios de resistencia producidos sobre los SiNW antes y después de producirse la reacción inmunológica. Con dicho sensor se alcanzó un LD de 1 pg mL⁻¹ para los tres analitos y se podían analizar muestras de sangre en tan sólo 45 min.

Feng y col. [Feng, 2012] describieron un inmunosensor tipo sándwich para cTnI y la proteína transportadora de ácidos grasos (HFABP), basado en la inmovilización de Abs de captura sobre nanocintas de grafeno (GONRs) y en el empleo de nanoesferas de TiP funcionalizadas con iones metálicos que fueron empleados como marcadores de los Abs secundarios. Los iones metálicos podían detectarse directamente mediante SWV sin necesidad de una preconcentración previa, y los picos voltamétricos

observados mostraban una estrecha relación con cada tipo de inmunorreacción. La presencia de una gran cantidad de iones metálicos sobre las nanoesferas de TiP permitió amplificar en gran medida las señales electroquímicas y la buena biocompatibilidad de las GONRs proporcionó una buena estabilidad de los inmunoconjugados sobre la superficie. Los inmunoensayos descritos mostraron una buena selectividad y sensibilidad para la detección de ambos marcadores cardíacos, obteniéndose un LD de 1 fg mL^{-1} para cTnI y de 3 fg mL^{-1} para HFABP, lo que permitió su aplicación al análisis de muestras de suero.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. INSTRUMENTACIÓN

3.1.1. APARATOS

Las medidas amperométricas se han realizado utilizando:

- un potenciostato ECO Chemie Autolab PGSTAT 10 equipado con el módulo EDC, y controlado mediante el software GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System): inmunosensores de *S. pneumoniae* y *S. aureus*.
- un potenciostato ECO Chemie Autolab PGSTAT 101 (**Figura 12**) controlado mediante el software NOVA 1.7: inmunosensores de cTnT, NT-proBNP, CRP y Lp(a) y medidas amperométricas realizadas con la plataforma de multidetección.



Figura 12. Potenciostato ECO Chemie Autolab PGSTAT 101, conectado a un SPAuE mediante un cable conector que actúa de interfase entre el electrodo y el equipo.

Las medidas cronoamperométricas con el inmunosensor dual se han realizado utilizando un detector amperométrico bicanal de Inbea Biosensores S. L. (**Figura 13**) equipado con el software IbGraph.

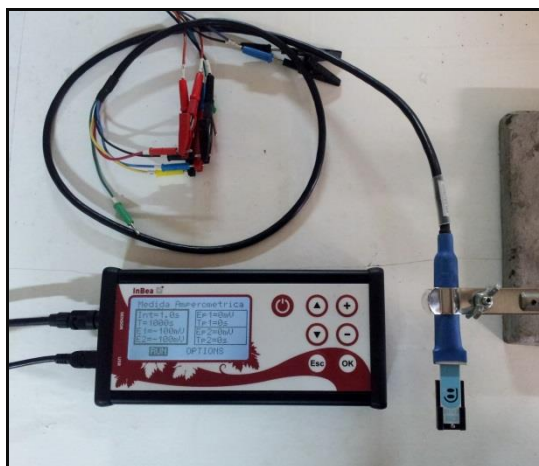


Figura 13. Potenciostato bicanal de Inbea Biosensores S. L, conectado a un SPdCE mediante un cable conector que actúa de interfase entre el electrodo dual y el bipotenciostato.

Las medidas de voltamperometría de onda cuadrada se han realizado utilizando un potenciostato PalmSens equipado con un conector multiplex CH8, y controlado mediante el software PStace 2.4 (**Figura 14**).

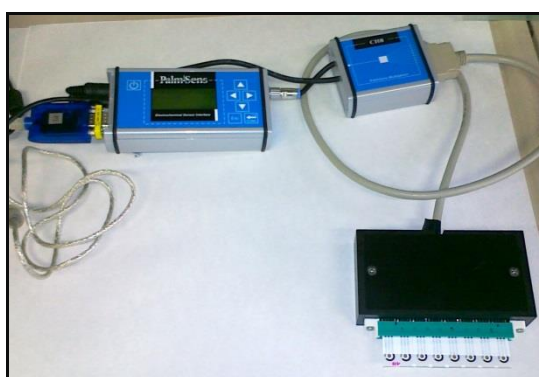


Figura 14. Potenciostato PalmSens equipado con conector multiplex CH8 que permite acoplar una tira de SPAuEs.

Para las medidas de pH se ha empleado un pH-metro de precisión Metrohm Herisau E-510, calibrado de la forma habitual con disoluciones reguladoras de pH 4.00, 7.00 y 9.00 a $(25 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$.

Para llevar a cabo el cultivo de bacterias y las diferentes etapas de incubación que requiere la modificación de las MBs, base de los magnetosensores desarrollados,

se ha empleado un incubador Optic Ivymen® System provisto de agitación y sistema de control de temperatura (Comecta S.A).

Todas las manipulaciones con *S. pneumoniae* se han realizado en una cabina de seguridad microbiológica Telstar biostar (mod. AH-100).

Para realizar la esterilización del material empleado se ha utilizado un autoclave Trade Raypa®.

Las amplificaciones PCR se han realizado en un termociclador Applied Biosystems 2720.

La separación de las MBs durante los procesos de modificación y lavado se ha realizado empleando un concentrador magnético DynaMag™-2 (product no. 123.21D, Invitrogen Dynal AS) (**Figura 15**).

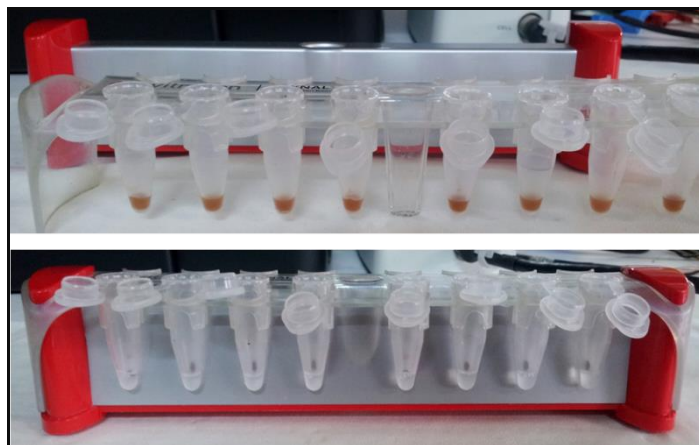


Figura 15. Concentrador magnético DynaMag™-2.

Para controlar la deposición de las MBs sobre la superficie del electrodo de trabajo se ha empleado un imán de neodimio (AIMAN GZ).

Otros aparatos utilizados han sido: baño de ultrasonidos (P-Selecta Ultrasons), agitador vortex (Heidolph) y agitador magnético (P-Selecta Agimatic).

3.1.2. ELECTRODOS

Todas las medidas electroquímicas se han llevado a cabo utilizando distintos tipos de electrodos desechables (**Figura 16**):

- Electrodos de trabajo serigrafiados con pasta de oro de curado a alta temperatura (**SPAuEs**) (DRP-220AT, $3.4 \times 1.0 \times 0.05$ cm, $\varnothing = 4$ mm, DropSens®). Cada tira incluye además del electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar de oro y un electrodo de pseudoreferencia de plata.
- Electrodos de trabajo serigrafiados de carbono (**SPCEs**) (DRP-110, $3.4 \times 1.0 \times 0.05$ cm, $\varnothing = 4$ mm, $A = 12.56 \text{ mm}^2$, DropSens®). Cada tira incluye, además del electrodo de trabajo, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de plata.
- Electrodos de trabajo duales serigrafiados de carbono (**SPdCEs**) (DRP-C1110, $3.4 \times 1.0 \times 0.05$ cm, DropSens®). Cada tira incluye dos electrodos de trabajo de carbono de forma elíptica ($A = 6.3 \text{ mm}^2$), un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de pseudoreferencia de plata.
- Electrodos de trabajo serigrafiados con pasta de oro (**SPAuEs**) ($\varnothing = 3$ mm), fabricados en los laboratorios del Departamento de Ciencia y Tecnología Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Tor Vergata de Roma. En este caso, cada tira incluye, además del electrodo de trabajo, un electrodo de pseudoreferencia de plata y un electrodo auxiliar de carbono.

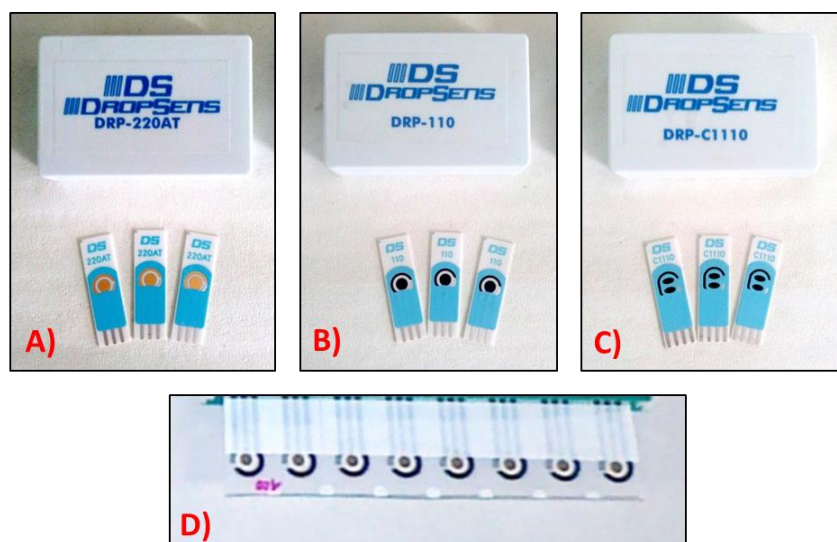


Figura 16. Electrodo serigrafiados desechables empleados: A) SPAuEs comerciales, B) SPCEs comerciales, C) SPdCEs comerciales y D) SPAuEs fabricados en el laboratorio.

- Plataforma de multidetección (**Figura 17**), formada por un chip de microfluídica que integra seis superficies sensoras, cada una de ellas compuesta por cuatro electrodos de oro: electrodo de trabajo (WE), electrodo de referencia (RE) (que lleva adherida una pasta de Ag/AgCl), electrodo auxiliar (AE) y un electrodo de inmovilización (ImE), localizado entre el RE y el WE. El chip se encuentra acoplado en una carcasa que incluye los canales de microfluídica, las conexiones eléctricas y un soporte móvil que integra seis imanes de neodimio, situados debajo de cada ImE, con el fin de capturar magnéticamente las MBs sobre su superficie.

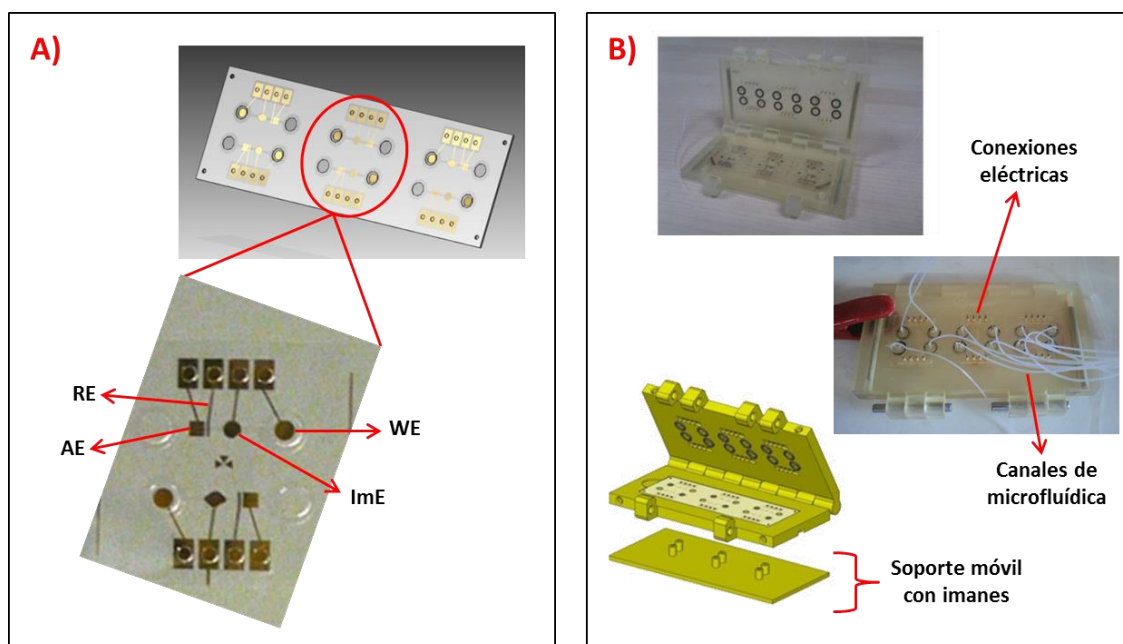


Figura 17. Plataforma de multidetección constituida por: A) chip de microfluídica formado por seis superficies sensoras y B) carcasa que incluye los canales de microfluídica, las conexiones eléctricas y un soporte móvil provisto de seis imanes.

3.2. REACTIVOS, DISOLUCIONES Y MUESTRAS

3.2.1. REACTIVOS

Todos los reactivos y disolventes empleados fueron de calidad para análisis. A continuación, se indican los reactivos utilizados agrupados según su uso:

- **Reactivos empleados en el pretratamiento y activación de los electrodos:**

- H_2SO_4 (95-97 %, Scharlau).
- KCl (Scharlau).
- Tetratiafulvaleno (TTF, Sigma-Aldrich®).
- Acetona (Sigma-Aldrich®).
- KNO_3 (≥ 99.0 %, Sigma-Aldrich®).
- $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (≥ 99.0 %, Sigma-Aldrich®).
- $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (98.5 %, Sigma-Aldrich®).

- **Reactivos empleados en la preparación de disoluciones reguladoras:**

- Tween®20 (Aldrich®).
- Fosfato disódico anhidro (Na_2HPO_4 , 99 %, Scharlau).
- Fosfato monosódico dihidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99 %, Scharlau).
- Carbonato sódico anhidro (Panreac).
- Hidrógeno carbonato de sodio (Scharlau).
- Clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano (Tris-HCl, 99 %, Scharlau).
- Ácido etilendiaminotetracético (sal disódica) (EDTA, Merck).
- NaCl (99.8 %, Scharlau).
- KCl (Scharlau).
- H_2SO_4 (95-97 %, Scharlau).
- Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES, Gerbu).
- Urea (Sigma-Aldrich®).

- **Partículas magnéticas modificadas comerciales:**
 - Partículas magnéticas modificadas con ProtA de *S. aureus* (**ProtA-MBs**), (Dynabeads® Protein A (approximately 45 kDa), 2.8 μm , 30 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).
 - Partículas magnéticas modificadas con estreptavidina (**Strp-MBs**), (Dynabeads® M-280 Streptavidin, 2.8 μm , 10 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).
 - Partículas magnéticas modificadas con grupos carboxílicos (**HOOC-MBs**), (Dynabeads® M270 Carboxylic Acid, 2.8 μm , 10 mg mL^{-1} , Invitrogen Dynal AS).

- **Reactivos empleados en la activación de grupos carboxílicos:**
 - N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC, Sigma-Aldrich®).
 - N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS, Sigma-Aldrich®).

- **Reactivos empleados en la modificación de SPCEs:**
 - N-[N α ,N α -bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercaptododecanamida (HS-NTA, Sigma-Aldrich®).

- **Reactivos empleados en el bloqueo de partículas magnéticas y electrodos:**
 - Albúmina de suero bovino (BSA-TYPE VH, 1066.0010, Gerbu).
 - Biotina (D-biotin Vitamin H1 Labeling Grade, DAB 10, GERBU Biotechnik GmbH).
 - Etanolamina (Sigma-Aldrich®).
 - Leche semidesnatada UHT (adquirida en un supermercado).

- **Reactivos empleados para llevar a cabo las medidas electroquímicas:**
 - H_2O_2 (Sigma-Aldrich®).

- Disolución comercial de TMB-H₂O₂ K-Blue (K-blue enhanced-activity substrate Neogen).
- **Anticuerpos:**
 - Anticuerpo específico del serotipo 37 de *S. pneumoniae* procedente de un suero policlonal de conejo (antiS37, obtenido en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC).
 - Anticuerpo específico del serotipo 37 de *S. pneumoniae* marcado con HRP (anti-S37-HRP, Eurogentec®).
 - Anticuerpo policlonal de conejo específico para el serotipo 18 de *S. pneumoniae* (ab20429, Abcam).
 - Anticuerpo policlonal de conejo específico para diferentes serotipos (3, 4, 6, 7, 9, 14, 18, 19 y 23) de *S. pneumoniae* PA1-7259 (Pierce).
 - Anticuerpo policlonal frente a la célula completa de *S. pneumoniae* R6 (anti-R, obtenido en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC).
 - Anticuerpo monoclonal específico de neumolisina (Anti-PLY, proporcionado por F. J. Méndez de la Universidad de Oviedo, España) **[de los Toyos et al., 1996]**.
 - Anticuerpo específico de la fosforilcolina (anti-TEPC 15, Sigma).
 - Anticuerpo frente al dominio C-terminal de LytA (anti-C-LytA, obtenido en el Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC **[Sánchez-Puelles, 1992]**).
 - Anticuerpo policlonal específico de la ProtA (*S. aureus*) (antiProtA, ab7243 Abcam).
 - Anticuerpo monoclonal biotinilado específico de la troponina T cardiaca (biotin-antiTnT, Cat 4T19B MAb 1C11, HyTest Ltd.).
 - Anticuerpo monoclonal conjugado con HRP específico de la troponina T cardiaca (antiTnT-HRP, Cat 4T19C MAb 9G6, HyTest Ltd.).

- Anticuerpo específico monoclonal de la NT-proBNP conjugado con HRP (antiNT-proBNP-HRP, Cat 4MT1C, HyTest Ltd.).
 - Anticuerpo específico de la CRP (antiCRP, Audit Diagnostics).
 - Anticuerpo específico de la CRP conjugado con biotina (biotin-antiCRP, Audit Diagnostics, biotinilado en el CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) [Esteban-Fernández de Ávila, 2013]).
 - Anticuerpo específico de Lp(a) (antiLp(a), Audit Diagnostics).
 - Anticuerpo específico de Lp(a) conjugado con biotina (biotin-antiLp(a), Audit Diagnostics, biotinilado en el CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN) [Esteban-Fernández de Ávila, 2014]).
- **Antígenos:**
 - Proteína A de *S. aureus* (ProtA from *S. aureus* Cowan I strain cells, P4931, Sigma-Aldrich®).
 - Proteína A marcada con HRP (ProtA-HRP, P8651, Sigma-Aldrich®).
 - Células de *S. aureus* atenuadas con ProtA (10 % wet w/v of essentially non-viable *S. aureus* Cowan strain cells, P7155, Sigma-Aldrich®).
 - Troponina T cardiaca humana (cTnT, Cat 8T13, HyTest Ltd.).
 - Péptido natriurético cerebral N-terminal (NT-proBNP, Cat 8NT2, HyTest Ltd.).
 - Proteína C reactiva humana (CRP, Audit Diagnostics).
 - Lipoproteína(a) (Lp(a), Audit Diagnostics).
 - **DNA (sondas y secuencias diana):**
 - Para la detección específica de los alelos típicos del gen *lytA* de *S. pneumoniae* se utilizaron los siguientes oligonucleótidos sintéticos (Sigma-Genosys):
 - Sonda de captura biotinilada (CSP_*lytA*): 5'-Biotin-TGCCGAAAACGCTTGATACA-3'.

- Sonda diana biotinilada (TSP_ *lytA*): 5'-Biotin-TGTATCAAGCGTTTTTCGGCA-3'.
 - Cebador directo (FSP_ *lytA*): 5'-TTGGGAACGGTTGCATCATG-3'.
 - Cebador reverso biotinilado (RSP_ *lytA*): 5'-Biotin-TCGTGCGTTTTAATTCCAGCT-3'.
- Amplicón del gen *lytA* (235 pb) generado por PCR asimétrica directa (daPCR): 5'-TTGGGAACGGTTGCATCATGCAGGTAGGACCTGTTGATAATGGTG CCTGGGACGTTGGGGGCGGTTGGAATGCTGAGACCTATGCAGCGGTTGAACTGA TTGAAAGCCATTCAACCAAAGAAGAGTTCATGACGGACTACCGCCTTTATATCGA ACTCTTACGCAATCTAGCAGATGAAGCAGGTTTGCCGAAAACGCTTGATACAGGG AGTTTAGCTGGAATTAACGCACGA-3'.
 - Sonda de captura modificada covalentemente en su extremo 3' con el marcador redox azul de metileno (MB) y en su extremo 5' con un grupo tiol (5'-d Thiol C6 SS-CGT CAA TCT TCT ATT TCT CCA CAC TGC T-methylene blue-3'), (Biosearch Technologies, Novato, CA).
 - Secuencias de DNA diana (Sigma-Aldrich®): 5'-GCA GTG TGG AGA AAT AGA AGA TTG ACG-3' (**T-27**); 5'-GCA GTG TGG ACA AAT AGA AGA TTG ACG-3' (**MM-27**); 5'-GGA GTG TGG AGA AAT AGA AGA T-3' (**T-22**); 5'-GCA GTG TGG AGA AAT AGA AGA T-3' (**MM-22**); 5'-GTG GAG AAA TAG AAG AT-3' (**T-17**); 5'-GTG GAC AAA TAG AAG AT-3' (**MM-17**); 5'-TGG AGA AAT AGA AG-3' (**T-14**); 5'-TGG ACA AAT AGA AG-3' (**MM-14**); 5'-GGA GAA ATA GAA G-3' (**T-13**) y 5'-GGA CAA ATA GAA G-3' (**MM-13**).

- **Bacterias:**

- *Streptococcus pneumoniae*: cepas Dawn (serotipo 37), R6 y TIGR4 (serotipo 4).

- *Streptococcus* del grupo *Mitis* (SGM: *S. mitis* NCTC 12261, *S. oralis* NCTC 11427, *S. sanguinis* CECT 480, *S. pseudopneumoniae* CCUG 44455 y *S. constellatus* NCTC 10708).
 - *Escherichia coli* (*E. coli*) (CECT 515, Colección Española de Cultivos Tipo).
 - *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*, CECT 59, Colección Española de Cultivos Tipo).
 - *Salmonella choleraesuis* (*S. choleraesuis*, CECT 700, Colección Española de Cultivos Tipo).
- **Otros reactivos empleados han sido:**

Para realizar los marcajes enzimáticos: polímero ultrasensible de estreptavidina-peroxidasa de rábano (pol Strp-HRP, Sigma®) y conjugado ultrasensible de estreptavidina-peroxidasa de rábano (Strp-HRP, Ref: 11 089 153 001, 500 U mL⁻¹, Roche).

Para la preparación de los cultivos bacterianos se emplearon los siguientes medios: medio Luria-Bertani Broth (LB broth, Scharlau), Luria-Bertani Agar (LB Agar, Scharlau), Tryptic Soy Agar (TSA, Fluka), Tryptic Soy Broth (TSB, Fluka) y medio C+Y: medio C ([**Lacks, 1960**]) suplementado con extracto de levadura al 0.08 % (p/v).

Compuestos ensayados como interferentes de los distintos inmunosensores desarrollados: troponina I cardíaca humana (cTnI, Cat 1210, Life Diagnosis), heparina (sal sódica, porcina) (H3149, Sigma-Aldrich®), IgG procedente de suero de conejo (I8140, Sigma-Aldrich®), IgG procedente de suero humano (I4506, Sigma-Aldrich®), IgG procedente de suero humano (I2511, Sigma-Aldrich®), albúmina de suero bovino (BSA-TYPE VH, 1066.0010, Gerbu), dímero-D (ab35949, Abcam), hemoglobina (Sigma-Aldrich®) y bilirrubina (Sigma-Aldrich®).

Para la validación de los inmunosensores desarrollados: suero humano deficiente en progesterona (S7394, Sigma-Aldrich®) y materiales de referencia con contenido certificado de CRP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) (WHO 1st International Standard for Human C-reactive protein, National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, code: 85/506) y de Lp(a) (56.1 mg dL^{-1}) (Randox Laboratories).

Otros reactivos utilizados fueron: 6-mercapto-1-hexanol ($\text{C}_6\text{-OH}$) (Sigma-Aldrich®), clorhidrato de tris-(2-carboxietil)fosfina (TCEP) (Sigma-Aldrich®), cloruro de hexaminorutenio (III) ($\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$) (Sigma-Aldrich®), Gelred™ (Biotium) y un kit comercial para la purificación de productos de PCR (Roche).

3.2.2. DISOLUCIONES

Para la preparación de todas las disoluciones, se ha utilizado agua desionizada obtenida mediante un sistema de purificación Millipore Milli-Q. A continuación, se indican las disoluciones utilizadas agrupadas según su uso:

- **Para el pretratamiento, activación y modificación de los electrodos de trabajo:**
 - **Disolución de H_2SO_4 0.5 M que contiene KCl 10 mM:** Se diluye la cantidad necesaria del ácido comercial (2.8 mL) y se disuelve la cantidad necesaria de sal (0.07 g) en 100 mL de agua desionizada.
 - **Disolución de KNO_3 0.1 M:** se disuelven 10.111 g del reactivo comercial en 1 L de H_2O desionizada.
 - **Disolución $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ / $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2 mM en KNO_3 0.1 M:** se disuelven 0.0422 g de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ y 0.0329 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ en 50 mL de KNO_3 0.1 M.
 - **Disolución de HS-NTA 1.5 mM:** se disuelve 1 mg del reactivo comercial en 700 μL de disolución reguladora $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM a pH 9.6.

Posteriormente, se diluyen 30 μL de la disolución anterior (3 mM) en 60 μL de la misma disolución reguladora.

- **Disoluciones reguladoras:**

- **Disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M:** se pesan 31.192 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, se disuelve en 1 L de agua desionizada y se filtra a vacío utilizando un filtro de 0.45 μm .
- **Disolución de Na_2HPO_4 0.2 M:** se pesan 28.392 g de Na_2HPO_4 , se disuelven en 1 L de agua desionizada y se filtra a vacío utilizando un filtro de 0.45 μm .
- **Disolución reguladora B&W 0.1 M (pH 8.2):** Se diluyen 5.3 mL de una disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M, 94.7 mL de una disolución de Na_2HPO_4 0.2 M y 20 μL de Tween®20 en 200 mL de agua desionizada.
- **Disolución reguladora PBS 0.01 M (pH 6.8):** se disuelven 0.2 g de NaH_2PO_4 , 1.14 g de Na_2HPO_4 , 8 g de NaCl y 0.2 g de KCl en 1 L de agua desionizada.
- **Disolución reguladora PBST 0.01 M (pH 6.8):** disolución reguladora PBS 0.01 M (pH 6.8) suplementada con un 0.01 % (p/v) de Tween®20.
- **Disolución reguladora TP 0.1 M (pH 7.0):** Se diluyen 39 mL de una disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M y 61 mL de una disolución de Na_2HPO_4 0.2 M en 200 mL de agua desionizada.
- **Disolución reguladora B&W 0.1 M (pH 7.5):** se prepara una disolución reguladora de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 M conteniendo un 0.01 % de Tween®20.
- **Disolución reguladora de Tris-HCl 20 mM que contiene NaCl 150 mM (pH 7.5):** se disuelven 1.2114 g de Tris-HCl y 8.766 g de NaCl en 1 L de agua desionizada.
- **Disolución reguladora de Tris-HCl 50 mM que contiene NaCl 20 mM (pH 7.2):** se disuelven 3.0285 g de Tris-HCl y 1.1688 g de NaCl en 1 L de agua desionizada.
- **Disolución reguladora TP 0.01 M (pH 7.4):** Se diluyen 1.9 mL de una disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 M y 8.1 mL de una disolución de Na_2HPO_4 0.2 M en 200 mL de agua desionizada.

- **Disolución reguladora urea/Tris (pH 7.5):** se disuelven 4.204 g de urea, 0.0186 g de EDTA y 0.03152 g de Tris-HCl en 10 mL de agua desionizada.
- **Disolución reguladora PBS 0.01 M conteniendo NaCl 0.138 M y KCl 2.7 mM (pH 7.4):** se disuelven 0.2 g de NaH_2PO_4 , 1.14 g de Na_2HPO_4 , 8 g de NaCl y 0.2 g de KCl en 1 L de agua desionizada.
- **Disolución reguladora PBST 0.01 M (pH 7.4):** se prepara suplementando la disolución reguladora de PBS 0.01 M (pH 7.4) anterior con un 0.05 % (p/v) de Tween®20.
- **Disolución reguladora PBS 0.01 M conteniendo NaCl 0.138 M y KCl 2.7 mM (pH 7.5):** se disuelven 0.2 g de NaH_2PO_4 , 1.14 g de Na_2HPO_4 , 8 g de NaCl y 0.2 g de KCl en 1 L de agua desionizada.
- **Disolución reguladora PBST 0.01 M (pH 7.5):** se prepara suplementando la disolución reguladora de PBS 0.01 M (pH 7.5) anterior con un 0.05 % (p/v) de Tween®20.
- **Disolución reguladora de TP 40 mM (pH 7.2):** se disuelven 2.36 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 3.56 g de Na_2HPO_4 en 1 L de agua desionizada tras obtener el pH indicado.
- **Disolución reguladora TP 10 mM conteniendo NaCl 1 M (pH 7.0):** se disuelven 0.59 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.89 g de Na_2HPO_4 y 58.44 g de NaCl en 1 L de agua desionizada tras obtener el pH indicado.
- **Disolución reguladora de TP 50 mM conteniendo NaCl 150 mM (pH 7.0):** se disuelven 2.96 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4.44 g de Na_2HPO_4 y 8.76 g de NaCl en 1 L de agua desionizada tras obtener el pH indicado.
- **Disolución reguladora de Tris-HCl 10 mM (pH 7.4):** se disuelven 0.394 g de Tris-HCl en 250 mL de agua desionizada.
- **Disolución reguladora MES 0.025 M (pH 5.0):** se disuelven 1.220 g del reactivo comercial en 250 mL de agua desionizada tras obtener el pH indicado.
- **Disolución reguladora de Tris-HCl 0.1 M (pH 7.2):** se disuelven 1.576 g del reactivo comercial en 100 mL de agua desionizada tras obtener el pH indicado.

- **Disolución reguladora TP 0.1 M (pH 8.0):** Se disuelven 2.165 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1.753 g de Na_2HPO_4 en 250 mL de agua desionizada tras obtener el pH indicado.
- **Disolución reguladora de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM (pH 9.6):** se disuelven las cantidades adecuadas de ambas sales (79.5 mg y 146.4 mg, respectivamente) en 50 mL de agua desionizada tras obtener el pH indicado.

Para obtener el pH requerido para cada disolución reguladora, éste se ajusta con HCl o NaOH 2 M según corresponda.

- **Disoluciones de anticuerpos y antígenos:**

- **Disolución de antiS37 $20 \mu\text{g mL}^{-1}$:** Se diluyen 17 μL de la disolución purificada de anticuerpo de $830 \mu\text{g mL}^{-1}$ en 683 μL de B&W 0.1 M a pH 8.2.
- **Disolución de antiS37-HRP $20 \mu\text{g mL}^{-1}$:** Se diluyen 6 μL de la disolución de anticuerpo marcado de $2.286 \mu\text{g mL}^{-1}$ en 693 μL de PBS 0.01 M a pH 6.8.
- **Disoluciones bacterianas de *S. pneumoniae*:** Se centrifugaron los distintos stocks a 4 °C (13.200 rpm, 10 min), y tras eliminar el sobrenadante, cada pellet se resuspende en un volumen apropiado de disolución reguladora PBS 0.01 M de pH 6.8 (o, en el caso del análisis de muestras reales, directamente en orina), para que la concentración final sea de 1.0×10^8 cfu mL^{-1} . Las disoluciones de menor concentración se obtienen mediante dilución con PBS 0.01 M a pH 6.8 (o con la muestra de orina).
- **Disolución de antiProtA $20 \mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluyen 5 μL de la disolución de anticuerpo comercial (10 mg mL^{-1}) en 500 μL de PBS 10 mM a pH 6.8. La preparación de disoluciones de concentración de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ se lleva a cabo diluyendo 200 μL de la disolución de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en 1 mL de la misma disolución reguladora.
- **Disolución de ProtA $200 \mu\text{g mL}^{-1}$:** se disuelve 1 mg del compuesto en 5 mL de PBS 10 mM a pH 6.8. Las disoluciones de menor concentración se preparan

por dilución del volumen adecuado de la disolución anterior con la misma disolución reguladora.

- **Disolución de *S. aureus* 4.8×10^6 células mL^{-1} :** Se diluyen 4.8 μL de la disolución comercial (10 % p/v) en 1 mL de PBS 10 mM a pH 6.8. La preparación de disoluciones de 4.8×10^6 células mL^{-1} se lleva a cabo diluyendo 100 μL de la disolución anterior en 1 mL de la misma disolución reguladora.
- **Disoluciones de *E. coli* y *S. aureus*:** Los cultivos de *E. coli* y *S. aureus* se crecen en medio de cultivo LB durante toda la noche a 37 °C bajo agitación constante (400 rpm), permitiendo que se alcance el estado estacionario. Posteriormente, se hacen diluciones en serie; se plaquean 10 μL de las mismas en placas de agar LB y se incuban 24 h a 37 °C para realizar el conteo de colonias. Para llevar a cabo las medidas amperométricas, los cultivos en fase estacionaria se diluyen de 1 a 10^7 cfu mL^{-1} con PBS 0.01 M de pH 6.8 suplementado con 0.9 % (p/v) de NaCl o leche, según corresponda.
- **Disoluciones de *S. choleraesuis*:** Los cultivos de *S. choleraesuis* se crecen en medio de cultivo TSB durante toda la noche a 37 °C con agitación constante (400 rpm), permitiendo que se alcance el estado estacionario. Posteriormente, se hacen diluciones en serie; se plaquean 10 μL de las mismas en placas de TSA y se incuban 24 h a 37 °C para realizar el conteo de colonias. Para llevar a cabo las medidas amperométricas, estos cultivos en fase estacionaria se diluyen de 1 a 10^7 cfu mL^{-1} con PBS 0.01 M a pH 6.8.
- **Disolución de cTnT 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se reconstituyen 0.5 mg del reactivo comercial en un 1 mL de disolución reguladora urea/Tris a pH 7.5. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución del volumen adecuado de la disolución anterior con PBS 0.01 M a pH 7.5.
- **Disolución de biotin-anticTnT 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluye 1 μL de la disolución de anticuerpo comercial (1.2 mg mL^{-1}) en 600 μL de Tris-HCl 20 mM a pH 7.5 suplementado con NaCl 150 mM.
- **Disolución de anticTnT-HRP 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluye 1 μL de la disolución de anticuerpo comercial (0.9 mg mL^{-1}) en 900 μL de PBS 0.01 M a pH 7.5.
- **Disolución de NT-proBNP 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluyen 5 μL de una disolución de 0.9 mg mL^{-1} en 900 μL de MES 0.025 M a pH 5.0. Las disoluciones de menor

concentración se preparan por dilución de esta disolución en la misma disolución reguladora.

- **Disolución de antiNT-proBNP-HRP 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluye 1 μL de la disolución comercial (1 mg mL^{-1}) en 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5.
- **Disolución de CRP 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluyen 2 μL de una disolución concentrada de 160 $\mu\text{g mL}^{-1}$ en 160 μL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de esta disolución en la misma disolución reguladora.
- **Disolución de antiCRP 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se prepara una disolución de 600 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluyendo 1 μL de una disolución concentrada de anticuerpo (60 mg mL^{-1}) en 100 μL de MES 0.025 M a pH 5.0. Posteriormente se diluyen 10 μL de esta disolución en 120 μL de la misma disolución reguladora.
- **Disolución biotin-antiCRP 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se prepara una disolución de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ diluyendo 5 μL de una disolución concentrada de anticuerpo (1 mg mL^{-1}) en 500 μL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Posteriormente se diluye 1 μL de esta disolución en 10 μL de la misma disolución reguladora.
- **Disolución de Lp(a) 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluye 1 μL de una disolución de Lp(a) concentrada (960 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en 100 μL de MES 0.025 M a pH 5.0.
- **Disolución de antiLp(a) 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluye 1 μL de una disolución concentrada de anticuerpo (40 mg mL^{-1}) en 200 μL de MES 0.025 M a pH 5.0.
- **Disolución de biotin-antiLp(a) 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se diluye 1 μL de una disolución concentrada de anticuerpo (1 mg mL^{-1}) en 10 μL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Las disoluciones de trabajo (2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) se preparan por dilución de la disolución anterior en la misma disolución reguladora.

- **Disoluciones de DNA:**

- **Disolución de sonda de captura biotinilada (*CSP_lytA*) 1 μM :** se diluyen 100 pmoles de la sonda (1 μL de una disolución 100 μM) en 100 μL de disolución B&W a pH 7.5.

- **Disolución sonda diana biotinilada (*TSP_lytA*) 0.1 μM :** se diluyen 10 pmoles de la sonda (1 μL de una disolución 10 μM) en 100 μL de Tris-HCl a pH 7.2.
- **Disolución de la sonda de captura 0.5 μM :** se diluye 1 μL de una disolución de la sonda de captura de concentración 200 μM en 400 μL de disolución reguladora TP 50 mM a pH 7.0 suplementada con NaCl 150 mM. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución adecuada de la disolución patrón de sonda de captura 0.5 μM en la misma disolución reguladora.
- **Disoluciones de las secuencias de DNA diana (T-27, MM-27, T-22, MM-22, T-17, MM-17, T-13, MM-13 y MM-14):** se diluye el volumen adecuado de las correspondientes disoluciones patrón de concentración 100 μM , en el volumen necesario de disolución reguladora TP 50 mM a pH 7.0 suplementada con NaCl 150 mM.
- **Disoluciones de enzimas, mediadores y sustratos:**
 - **Disolución patrón de TTF 0.5 M:** se disuelven 5.1 mg de TTF en 50 μL de acetona.
 - **Disolución de polímero Strp-HRP 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** Se diluyen 10 μL de la disolución comercial de polímero de Strp-HRP (1.0 mg mL^{-1}) en 990 μL de PBST 0.01 M a pH 7.4.
 - **Disolución de conjugado Strp-HRP 1:1000:** se diluye 1 μL de la disolución comercial en 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5.
 - **Disolución comercial de TMB- H_2O_2 diluida 10 veces:** se diluyen 10 μL de la disolución comercial de TMB- H_2O_2 en 100 μL de disolución reguladora TP 0.1 M a pH 7.0.
 - **Disolución patrón de H_2O_2 0.35 mM:** se diluyen 35 μL de H_2O_2 0.1 M en 1 mL de TP 0.1 M a pH 7.0.

- **Otras disoluciones:**

- **Disolución de ProtA-HRP 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se prepara una disolución de ProtA-HRP de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ disolviendo 1 mg del compuesto comercial en 8 mL de PBS 10 mM a pH 6.8. La disolución de 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se prepara por dilución del volumen adecuado de la disolución anterior con la misma disolución reguladora.
- **Disolución de BSA 266 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se prepara una disolución de BSA 1 mg mL^{-1} disolviendo 1 mg del producto comercial en 1 mL de PBS 0.01 M a pH 7.4. La disolución de trabajo se prepara por dilución del volumen adecuado de la disolución anterior con la misma disolución reguladora.
- **Disoluciones de BSA de 5 y 0.5 mg mL^{-1} :** se prepara una disolución de BSA 5 mg mL^{-1} disolviendo 5 mg de BSA en 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5. La disolución de menor concentración se prepara por dilución de la disolución anterior con la misma disolución reguladora.
- **Disolución de biotina 0.005 % (w/v):** se prepara una disolución de biotina 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ disolviendo 1 mg del reactivo comercial en 2 mL de Tris-HCl 20 mM a pH 7.5. Posteriormente, se toman 10 μL de la disolución anterior y se llevan a un volumen final de 100 μL utilizando la misma disolución reguladora.
- **Disolución de cTnI 1 ng mL^{-1} :** se diluye 1 μL de una disolución de concentración 100 ng mL^{-1} en un volumen final de 100 μL de PBS 0.01 M a pH 7.5.
- **Disolución de heparina 4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se prepara una disolución de heparina 6000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ disolviendo 6 mg del reactivo comercial en 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior con la misma disolución reguladora.
- **Disolución de IgG procedente de suero de conejo (I8140) 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$:** se prepara una disolución de IgG 10 mg mL^{-1} disolviendo 10 mg del producto comercial en 1 mL de TP 0.01 M a pH 7.4. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior.

- **Disolución de IgG procedente de suero humano (I4506) 1.2 mg mL⁻¹:** se prepara una disolución de IgG de 10 mg mL⁻¹ disolviendo 10 mg del producto comercial en 1 mL de PBST 0.01 M de pH 7.5. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior.
- **Disolución de IgG procedente de suero humano (I2511) 0.4 mg mL⁻¹:** se prepara una disolución de IgG 5 mg mL⁻¹ disolviendo 5 mg del producto comercial en 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior.
- **Disolución de dímero-D 0.04 µg mL⁻¹:** se prepara una disolución de dímero-D 2 µg mL⁻¹ por dilución de 1 µL del reactivo comercial (1 mg mL⁻¹) en 500 µL de PBS 0.01 M a pH 7.5. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de la disolución anterior.
- **Disoluciones de dímero-D de 0.5 y 0.04 µg mL⁻¹:** se prepara una disolución de dímero-D 2 µg mL⁻¹ diluyendo 1 µL del reactivo comercial (1 mg mL⁻¹) en 500 µL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Las diluciones de concentración inferior se preparan por dilución de la disolución anterior.
- **Disolución de etanolamina 1 M:** Se diluyen 30 µL de etanolamina comercial (destilada en el laboratorio y conservada en viales en atmósfera de N₂) en 500 µL de disolución reguladora TP 0.1 M a pH 8.0.
- **Disolución de TCEP 3000 µg mL⁻¹:** se disuelven 3 mg de TCEP en 1 mL de disolución reguladora TP 50 mM a pH 7.0 suplementada con NaCl 150 mM.
- **Disolución de 6-mercapto-1-hexanol 2 mM:** se diluyen 0.4 µL del reactivo comercial en 1.5 mL de disolución reguladora TP 50 mM a pH 7.0 suplementada con NaCl 150 mM.
- **Disolución de cloruro de hexaminorutenio (III) 0.2 mM:** se disuelven 0.6192 g del reactivo comercial en 10 mL de disolución reguladora Tris-HCl 10 mM a pH 7.4.
- **Disolución de NaOH 2 M:** se disuelven 40 g del reactivo comercial en 500 mL de H₂O desionizada.
- **Disolución de HCl 2M:** se diluyen 16.6 mL del reactivo comercial en 100 mL de agua desionizada.

- **Disolución de NaCl 0.9 % (p/v):** se disuelven 9 g del reactivo comercial en 100 mL de agua desionizada.
- **Disolución de KCl 3 M:** se disuelven 2.237 g del reactivo comercial en 10 mL de agua desionizada.
- **Disolución de EDC/sulfo-NHS 50 mg mL⁻¹:** se disuelven 10 mg de EDC y 10 mg de sulfo-NHS en 400 µL de MES 25 mM a pH 5.0.
- **Disolución de bloqueo con leche semidesnatada UHT 1/2:** la leche semidesnatada comercial se diluye a la mitad con PBS 10 mM a pH 7.5.
- **Disolución de hemoglobina 5 mg mL⁻¹:** se disuelven 5 mg de hemoglobina en 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5.
- **Disolución de bilirrubina 20 µg mL⁻¹:** se prepara una disolución de bilirrubina 1 mg mL⁻¹ disolviendo 1 mg del reactivo comercial en 1 mL de PBST 0.01 M de pH 7.5. Posteriormente se diluye 1 µL de la disolución anterior en 50 µL de la misma disolución reguladora.

3.2.3. MUESTRAS

- **Muestras de orina contaminadas con *S. pneumoniae*:** se centrifugan los distintos stocks a 4 °C (13,200 rpm, 10 min) y, tras eliminar el sobrenadante, cada pellet se resuspende en el volumen apropiado de orina (proporcionada por un voluntario sano) para que la concentración final sea de 1.0×10⁸ cfu mL⁻¹. Las disoluciones de menor concentración se preparan por dilución de ésta con la muestra de orina.
- **Muestras de leche contaminadas con *S. aureus*:** las muestras de leche semidesnatada (adquiridas en un supermercado) se inoculan a dos niveles de concentración de *S. aureus* (10 y 100 cfu mL⁻¹) y se someten a un tratamiento con ultrasonidos durante 30 min para facilitar la accesibilidad de la ProtA mediante la lisis celular de la pared bacteriana.
- **Suero humano liofilizado libre de progesterona (S7394, Sigma) contaminado con cTnT:** el producto liofilizado contenido en una ampolla de vidrio se

reconstituye añadiendo 1 mL de PBS 0.01 M a pH 7.5. Una vez disuelto, se contamina con 20 ng mL⁻¹ de cTnT y se diluye 50 veces para llevar a cabo la determinación.

- **Suero humano liofilizado libre de progesterona (S7394, Sigma) contaminado con NT-proBNP:** el producto liofilizado contenido en una ampolla de vidrio se reconstituye añadiendo 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Una vez disuelto, se diluye 10 veces con la misma disolución reguladora y se contamina con NT-proBNP a tres niveles de concentración: 0.10, 0.50 y 2.0 ng mL⁻¹.
- **Suero humano liofilizado libre de progesterona (S7394, Sigma) contaminado con Lp(a):** el producto liofilizado contenido en una ampolla de vidrio, se reconstituye añadiendo 1 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5. Una vez disuelto, se contamina con 200 µg mL⁻¹ de Lp(a) y se diluye 40 veces para llevar a cabo la determinación.
- **Material de referencia con un contenido certificado de CRP (100 µg mL⁻¹):** se reconstituyen 50 µg del reactivo liofilizado en 0.5 mL de PBST 0.01 M a pH 7.5, disolviéndose totalmente con agitación suave. La determinación de la CRP se lleva a cabo tras diluir 1000 veces la muestra reconstituida con la misma disolución reguladora.

La misma muestra se ha empleado en la validación del magnetoinmunosensor dual; para ello, la muestra reconstituida se diluye 100 veces y se contamina con 1 ng mL⁻¹ de NT-proBNP. La determinación simultánea de ambos marcadores cardiacos se realiza aplicando una dilución 1/10 a la disolución resultante con la misma disolución reguladora.
- **Material de referencia con contenido certificado de Lp(a) (56.1 mg dL⁻¹):** se reconstituyen 0.561 mg del reactivo liofilizado en 1 mL de agua desionizada a temperatura ambiente y se disuelve totalmente con agitación. A continuación, se deja reposar durante 30 min y se almacena a 4 °C. La determinación de la

Lp(a) se lleva a cabo tras diluir 100 veces la muestra reconstituida con PBST 0.01 M a pH 7.5.

3.3. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

Se han implementado diferentes inmunosensores y genosensores electroquímicos para la detección de bacterias (*S. pneumoniae* y *S. aureus*) y biomarcadores cardíacos (cTnT, NT-proBNP, CRP y Lp(a)) empleando distintos tipos de electrodos serigrafiados desechables y diferentes estrategias de inmovilización de los biorreceptores específicos utilizados (anticuerpos y sondas de DNA). A continuación se describen los procedimientos experimentales seguidos para la preparación de los biosensores desarrollados.

3.3.1. PRETRATAMIENTO Y MODIFICACIÓN DE LOS ELECTRODOS INDICADORES

En los inmunosensores desarrollados para la determinación de *S. pneumoniae*, *S. aureus* y cTnT se realiza un pretratamiento de los electrodos serigrafiados con pasta de oro de curado a alta temperatura, consistente en la deposición de 50 μL de una disolución acuosa de H_2SO_4 0.5 M que contiene KCl 10 mM y en la realización de diez voltamperogramas cíclicos consecutivos de potencial, entre 0.00 y +1.25 V, frente al electrodo de pseudoreferencia de Ag, a una velocidad de barrido de 100 mV s^{-1} .

Además, en el caso de los inmunosensores desarrollados para la determinación de las bacterias citadas, la superficie de los electrodos pretratados se modificaba depositando 5 μL de una disolución de TTF 0.5 M que se dejaba secar a temperatura ambiente.

La determinación de cTnT con el chip de microfluídica requiere una activación electroquímica previa del chip. Para ello, tras realizar un bloqueo de todo el sistema con BSA al 2 % (p/v) para evitar posibles adsorciones inespecíficas, los WEs se activan electroquímicamente, aplicando ocho pasos de potencial consecutivos (entre -2.0 y 0.0 V) de 10 s cada uno, en medio acuoso KNO_3 0.1 M.

3.3.2. INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE *Streptococcus pneumoniae*: PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE MEDIDAS

A continuación se describe la fabricación de inmunosensores y genosensores amperométricos para la determinación de *S. pneumoniae* realizada en esta Tesis Doctoral; estos biosensores están basados en el empleo de distintos tipos de MBs (ProtA-MBs y Strp-MBs), anticuerpos y sondas específicas de DNA, HRP como marcador enzimático y SPAuEs como sustratos electródicos.

3.3.2.1. Magnetoinmunosensores

Modificación de las ProtA-MBs: el magnetoinmunosensor basado en el empleo de MBs modificadas con ProtA se prepara depositando 10 μL de la suspensión comercial de ProtA-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL y lavando las MBs dos veces con 100 μL de disolución reguladora B&W de pH 8.2 para eliminar el exceso de NaN_3 (empleado como conservante del producto comercial). Cada etapa de lavado consiste en la resuspensión de las MBs en la disolución de lavado mediante agitación vigorosa, seguida de la eliminación del sobrenadante tras colocar el tubo en el concentrador magnético durante 2 min (tiempo recomendado en las especificaciones del producto para asegurar la fijación de todas las partículas por la acción del imán). A continuación, se añaden 100 μL de la disolución de anticuerpo de captura (antiS37 , 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se incuba a 37 °C durante 60 min en un agitador a 600 rpm. Para eliminar el anticuerpo no inmovilizado sobre las MBs se realizaban dos lavados con 100 μL de disolución B&W (pH 8.2), quedando las MBs preparadas para llevar a cabo el procedimiento de inmunoensayo. Seguidamente, se añaden 200 μL de la disolución de bacteria (preparada en PBS a pH 6.8) y se incuba durante 60 min (600 rpm, 37 °C). Tras colocar la mezcla 2 min en el concentrador y separar el sobrenadante, las partículas modificadas se lavan dos veces siguiendo el procedimiento anterior (B&W de pH 8.2) y, una vez más, con disolución TP 0.1 M a pH 7.0. A continuación, las MBs se incuban durante 60 min (600 rpm, 37 °C) con 100 μL de la disolución de anticuerpo de detección (antiS37-HRP , 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en disolución reguladora PBS 0.01 M a

pH 6.8. Transcurrido el tiempo de reacción, las partículas se lavan dos veces con TP a pH 7.0, y se resuspenden en 45 μL de la misma disolución reguladora.

Detección amperométrica: cada electrodo, pretratado y modificado con TTF, se conecta al potenciostato y, una vez colocado un imán de neodimio debajo del electrodo de trabajo, se depositan 45 μL de la suspensión de MBs y se inicia el experimento electroquímico controlado por el sistema informático. Una vez alcanzado el estado estacionario al potencial de medida (-0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag), se agregan 5 μL de la disolución de H_2O_2 0.35 mM, produciéndose su reducción en presencia de HRP mediada por el TTF. Una vez terminada la medida (transcurridos 180 s tras la adición de sustrato), se desconecta el electrodo y se desecha. Los datos obtenidos se almacenan en el ordenador, pudiendo ser tratados posteriormente mediante el programa informático.

En la **Figura 18** se muestra esquemáticamente el procedimiento experimental seguido, y las reacciones implicadas en la reducción del H_2O_2 en presencia de HRP mediada por el TTF.

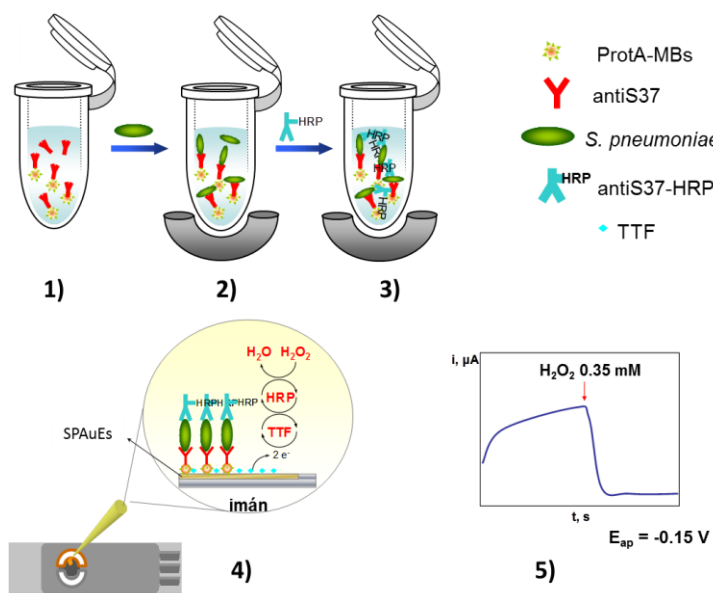


Figura 18. Esquema experimental del desarrollo del magnetoinmunosensor de *S. pneumoniae*: 1) Inmovilización de los anticuerpos de captura sobre las ProtA-MBs; 2) Reconocimiento MBs-antiS37-bacteria; 3) Incubación con antiS37-HRP; 4) Deposición de las MBs modificadas sobre los TTF-SPAuEs; 5) Detección amperométrica de la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por TTF.

3.3.2.2. Magnetoinmunosensores basados en una estrategia inmuno-PCR

Con el fin de mejorar la sensibilidad de la determinación del *S. pneumoniae*, se desarrolló un método basado en el empleo de una inmunoreacción para capturar selectivamente la bacteria objetivo y una estrategia de PCR asimétrica directa (daPCR), que permite la amplificación y detección de secuencias específicas de ácidos nucleicos sin necesidad de extraer previamente el material genético de la célula, generando preferentemente amplicones de cadena sencilla. Así, en este trabajo se emplea dicha modalidad de PCR para amplificar una región característica de 235 pares de bases (bp) del gen que codifica la principal autolisina neumocócica (*lytA*), un factor de virulencia de este patógeno. Los amplicones de cadena sencilla y biotinilados obtenidos mediante daPCR de bacterias capturadas sobre ProtA-MBs modificadas con el anticuerpo de captura, se detectan, a continuación, mediante hibridación con una sonda de captura biotinilada de 20-mer específica, inmovilizada sobre Strp-MBs, marcando el híbrido biotinilado resultante con un polímero de Strp-HRP.

Obtención del amplicón *lytA* (235 bp) biotinilado de cadena sencilla: el procedimiento de obtención del amplicón se inicia tomando 20 µL de la suspensión comercial de ProtA-MBs y lavándolas dos veces con 100 µL de disolución B&W (pH 8.2), imantando 2 min entre ambos lavados y retirando posteriormente el sobrenadante. A continuación, se realiza la incubación con 100 µL del anticuerpo de captura (antiS37, 40 µg mL⁻¹) durante 60 min (600 rpm, 37 °C). Tras realizar dos lavados con 100 µL de B&W (pH 8.2), se añaden 200 µL de la disolución de bacteria (preparada en PBS a pH 6.8), y se incuba durante 60 min (600 rpm, 37 °C). Seguidamente, se realizan dos lavados con 100 µL de B&W (pH 8.2) y otro lavado con 100 µL de agua estéril, resuspendiendo finalmente las MBs modificadas en 62 µL de agua estéril. Para realizar la daPCR de la bacteria capturada sobre las MBs, se adicionan a la suspensión de MBs-antiS37-*S. pseudopneumoniae* los siguientes reactivos: 1.6 µL de cebador directo (5 µM), 16 µL de cebador reverso biotinilado (5 µM), 10 µL de disolución reguladora de la DNA polimerasa, 10 µL de desoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) y 1 µL de TAQ polimerasa. Las condiciones de daPCR aplicadas a la mezcla anterior son las siguientes: 3 ciclos de pre-PCR (95 °C, 4 min; 60 °C, 2 min; 72 °C, 4 min), 35 ciclos de

PCR (94 °C, 1 min; 60 °C, 1 min; 72 °C, 1 min) y 3 min de extensión final a 72 °C. Los amplicones obtenidos se confirman mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5 %) por tinción con GelRed™ y se purifican empleando un kit comercial para la purificación de productos de PCR.

Modificación de las Strp-MBs: se depositan 10 µL de la suspensión comercial de Strp-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL, y se realizan dos lavados controlados magnéticamente con 100 µL de disolución B&W a pH 7.5. A continuación, se añaden 100 µL de una disolución 1 µM ($\cong 100$ pmoles) de la sonda de captura de DNA biotinilada y se incuba durante 60 min (600 rpm, 37 °C). Las partículas se lavan dos veces con 100 µL de disolución Tris-HCl a pH 7.2 y se añade la cantidad deseada de sonda complementaria (oligo diana sintético o amplicón obtenido por daPCR), incubándose de nuevo durante 60 min (600 rpm, 37 °C). Las partículas modificadas con el híbrido se lavan dos veces siguiendo el procedimiento anterior (Tris-HCl de pH 7.2), añadiéndose posteriormente 100 µL de una disolución de polímero de Strp-HRP ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en PBST a pH 7.4, y se deja reaccionar durante 60 min (600 rpm, 37 °C). Se realizan cinco lavados de 5 min cada uno (600 rpm, 37 °C) con 500 µL de PBST y un último lavado con PBS a pH 7.4 y las MBs modificadas se resuspenden en 45 µL de PBS 0.01 M a pH 7.4.

Detección amperométrica: la deposición de la suspensión de MBs modificadas sobre la superficie de los SPAuEs y la detección del proceso de hibridación mediante la medida de la respuesta amperométrica se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.2.1.

En la **Figura 19** se muestra esquemáticamente el procedimiento experimental seguido y las reacciones enzimática y electródica involucradas en la detección amperométrica con el magnetogenosensor.

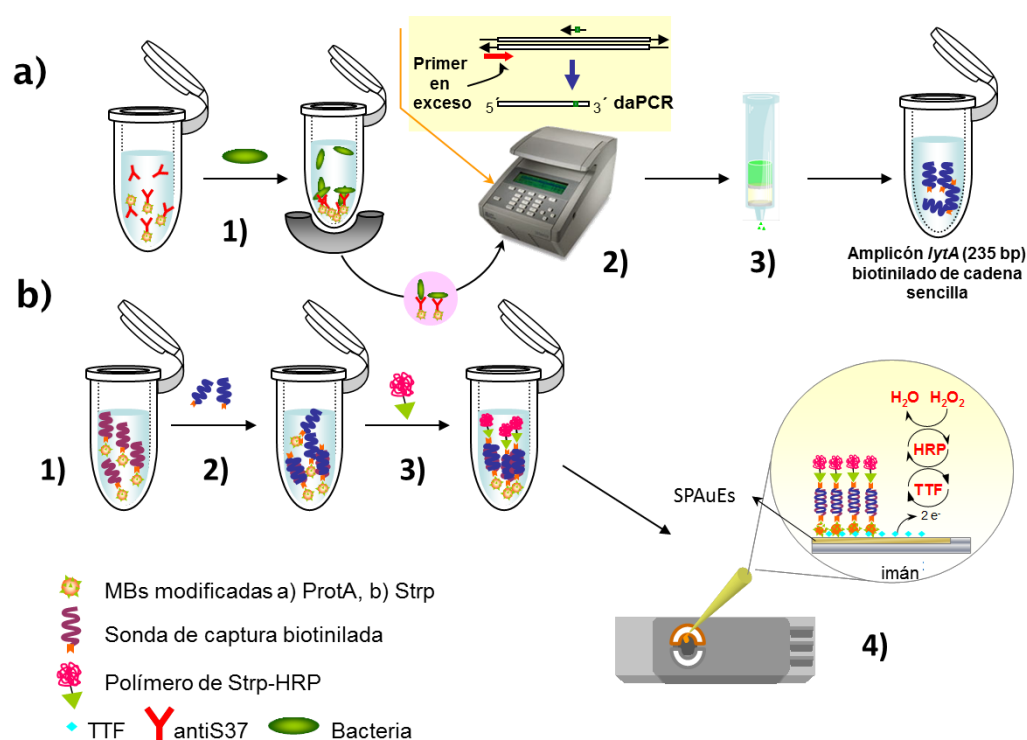


Figura 19. Esquema experimental involucrado en la estrategia inmuno-PCR: (a1) Modificación de las ProtA-MBs con el antiS37 y la bacteria; (a2) daPCR de las MBs modificadas; (a3) Purificación del amplicón; (b1) Modificación de Strp-MBs con la sonda de captura biotinilada; (b2) Proceso de hibridación con el amplicón; (b3) Marcatez enzimático del híbrido resultante con el polímero de Strp-HRP; (b4) Captura magnética de las MBs modificadas con el híbrido y el marcador enzimático sobre los TTF-SPAuEs.

3.3.3. MAGNETOINMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus*: PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE MEDIDAS

El magnetoinmunosensor desarrollado en este trabajo está basado en el reconocimiento de la ProtA del *S. aureus* por un antiProtA. Como se ha explicado en apartados anteriores, la ProtA es específica del *S. aureus*, se encuentra en su superficie y reacciona selectivamente con el fragmento Fc de la mayoría de las IgGs.

Utilizando este metabolito específico, se ha desarrollado un magnetoinmunosensor amperométrico para la detección de esta bacteria, empleando ProtA-MBs, antiProtA, ProtA-HRP como marcador enzimático y SPAuEs como sustratos electródicos. En el formato de inmunoensayo empleado, de tipo competitivo directo,

la ProtA del *S. aureus* y la ProtA-HRP compiten por los sitios de unión del antiProtA inmovilizado sobre la superficie de las ProtA-MBs.

Modificación de las ProtA-MBs: en primer lugar se inmoviliza el anticuerpo de captura (antiProtA) sobre las ProtA-MBs; para ello, se llevan 5 μL de la suspensión comercial de partículas a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavan dos veces con B&W a pH 8.2 y una vez con PBS a pH 6.8, imantando 2 min entre cada lavado. Las partículas se incuban durante 30 min en 100 μL de la disolución de antiProtA ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) con agitación y temperatura controlada (600 rpm, 37°C), condiciones que se mantienen durante todos los pasos de incubación. Tras realizar dos lavados con 100 μL de PBS a pH 6.8, las antiProtA-MBs se incuban durante 30 min, manteniendo las mismas condiciones, en 50 μL de la disolución de ProtA o de la suspensión bacteriana (células comerciales no viables o cultivos bacterianos sometidos o no a lisis previa por ultrasonidos; en los casos en que se requiere lisis celular, se sumerge la cantidad adecuada de la disolución de células de *S. aureus* preparada en NaCl 0.9 % en un baño de ultrasonidos durante 30 min). Después de realizar dos lavados con 100 μL de PBS, se lleva a cabo una incubación durante 30 min con 200 μL de ProtA-HRP ($0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Por último, las MBs modificadas se lavan dos veces con 100 μL de TP a pH 7.0, y se resuspenden en 45 μL de la misma disolución reguladora.

Detección amperométrica: la deposición de la suspensión de MBs modificadas sobre la superficie de los SPAuEs y la detección amperométrica del proceso de reducción del H_2O_2 mediado por el TTF, se realizan de forma análoga a la descrita en el Apdo. 3.3.2.1.

En la **Figura 20** se muestra un esquema del magnetoinmunosensor de ProtA/*S. aureus* desarrollado.

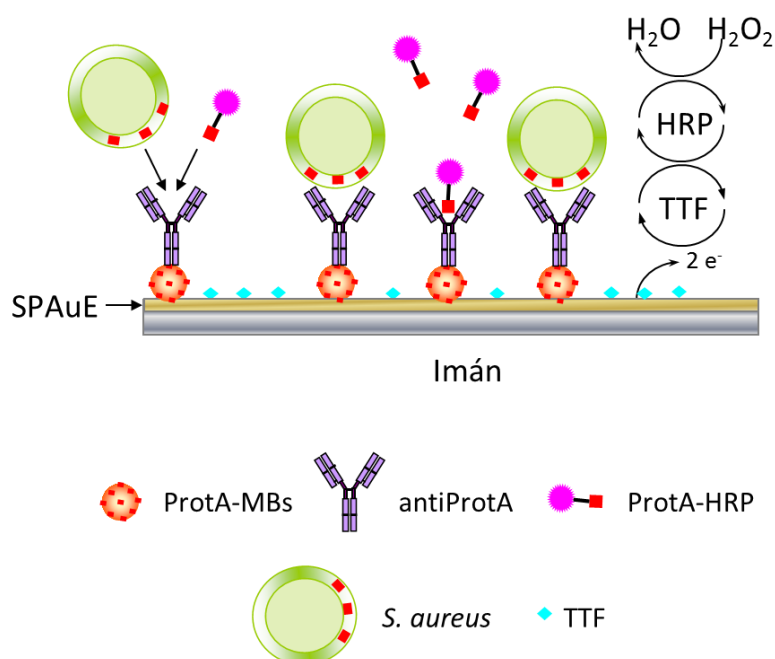


Figura 20. Esquema del inmunoensayo competitivo directo implementado para el desarrollo del magnetoinmunoensensor de ProtA/*S. aureus*, con detalle del esquema de reacciones involucrado en el proceso de reducción enzimática del H₂O₂ mediado por TTF.

3.3.4. INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES CARDIACOS: PREPARACIÓN Y OBTENCIÓN DE MEDIDAS

En este apartado se van a describir los procedimientos de fabricación y obtención de medidas utilizados con los inmunosensores amperométricos desarrollados en esta Tesis Doctoral para la determinación de diferentes biomarcadores cardiacos de relevancia clínica, empleando en todos los casos diferentes tipos de SPEs como superficies transductoras y la enzima peroxidasa como marcador enzimático.

3.3.4.1. Magnetoinmunosensores para la determinación de troponina T cardiaca

El magnetoinmunoensensor amperométrico de cTnT desarrollado, está basado en el empleo de Strp-MBs y en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich. La detección electroquímica se realizó mediante dos metodologías distintas: realizando

amperometría empleando SPAuEs, y cronoamperometría empleando un chip de microfluídica (descrito en el Apdo. 3.1.2).

3.3.4.1.1. Dispositivo basado en el empleo de electrodos serigrafiados comerciales

Para la modificación de las partículas magnéticas, se depositan 5 μL de la suspensión comercial de Strp-MBs en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se lavan dos veces con 100 μL de disolución reguladora B&W a pH 7.5, imantando 2 min entre ambos lavados. A continuación, se añaden 100 μL de la disolución de anticuerpo de captura biotinilado (biotin-anticTnT, 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en Tris-HCl a pH 7.5 y se incuba durante 30 min en un agitador a 600 rpm y 37 °C. A continuación, las partículas se imantan durante 2 min y se lavan dos veces con 100 μL de PBS a pH 7.5. Seguidamente, se realiza un bloqueo de los posibles grupos de estreptavidina que hayan quedado libres al no enlazar anticuerpo de captura con 100 μL de una disolución de biotina al 0.005 % (p/v) (preparada en Tris-HCl a pH 7.5) durante 15 min. Posteriormente, se realizan dos lavados con PBS a pH 7.5 y se incuba durante 30 min en 100 μL de la disolución de cTnT preparada en la misma disolución reguladora. Tras concentrar durante 2 min y separar el sobrenadante, las MBs modificadas se lavan dos veces con PBS a pH 7.5 para eliminar las especies no enlazadas y, seguidamente, se incuban durante 45 min con 100 μL de la disolución de anticuerpo de detección (anticTnT-HRP, 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en PBS a pH 7.5. Transcurrido el tiempo de reacción, las partículas se lavan cinco veces con TP 0.1 M a pH 7.0 durante 2 min en el incubador (600 rpm, 37 °C). Las MBs modificadas se resuspenden entonces en 45 μL de TP a pH 7.0 y se imantan sobre la superficie de los SPAuEs pretratados siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.1. La fijación de las partículas a la superficie del electrodo se realiza mediante un imán de neodimio situado bajo el electrodo de trabajo. Se inicia la amperometría y, alcanzado el estado estacionario al potencial de medida (-0.10 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag), se añaden 5 μL de la disolución comercial de TMB- H_2O_2 . Una vez terminada la medida (200 s tras la adición del sustrato), se desconecta y se desecha el electrodo.

En la **Figura 21** se muestra un esquema del procedimiento experimental llevado a cabo para la obtención del magnetoinmunosensor de cTnT.

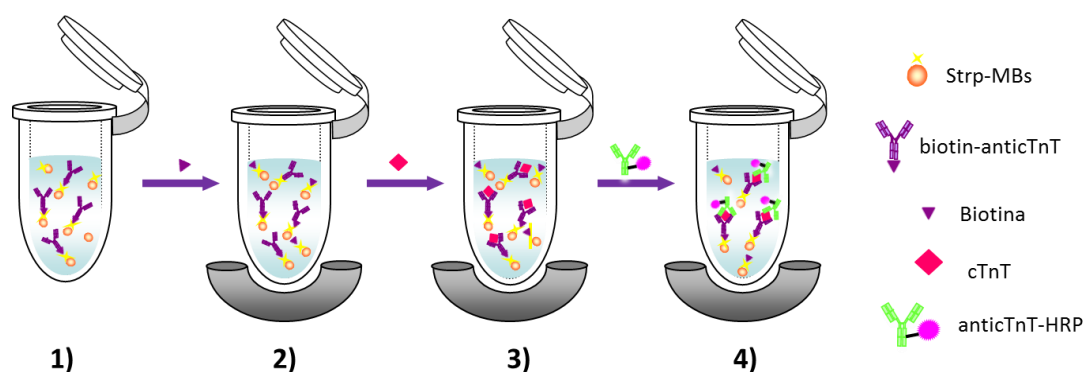


Figura 21. Protocolo de inmunoensayo tipo sándwich empleando Strp-MBs para el desarrollo del magnetoinmunosensor de cTnT: 1) Inmovilización del biotina-anticTnT sobre las Strp-MBs; 2) Bloqueo con biotina; 3) Reconocimiento MBs-biotina-anticTnT-cTnT; 4) Incubación con anticTnT-HRP.

3.3.4.1.2. Dispositivo basado en el empleo de un chip de microfluídica

El chip de microfluídica empleado en este caso (previamente activado como se ha descrito en el Apdo. 3.3.1) está formado por seis superficies sensoras. Tras realizar la activación electroquímica, se lleva a cabo una caracterización de la superficie electródica realizando voltamperogramas cíclicos (50 mV s^{-1}) y aplicando diferentes velocidades de flujo ($5, 10, 20, 40, \text{ y } 75 \mu\text{L min}^{-1}$) en medio $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O} / \text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2 mM , preparado en KNO_3 0.1 M . La modificación de las Strp-MBs se realiza siguiendo el procedimiento descrito en el apartado anterior (3.3.4.1.1) pero resuspendiéndose finalmente en $500 \mu\text{L}$ de PBS a pH 7.5. A continuación, tras haber hecho pasar por el sistema disolución reguladora PBS ($10 \mu\text{L min}^{-1}$), se realiza un bloqueo con BSA al 2 % (p/v) ($1 \mu\text{L min}^{-1}$, 15 min) para minimizar las adsorciones inespecíficas del sustrato. Una vez realizado el bloqueo, se coloca el soporte móvil bajo la carcasa contenedora del chip, con objeto de situar los imanes bajo la superficie de los electrodos de inmovilización, y las Strp-MBs modificadas se introducen en el sistema, a una velocidad de flujo de $20 \mu\text{L min}^{-1}$. Posteriormente, el chip contenido en la carcasa compuesta por los canales de microfluídica, las conexiones eléctricas, y el soporte móvil con los seis imanes, se conecta al potencióstato y, tras hacer pasar la disolución comercial de TMB- H_2O_2 ($5 \mu\text{L min}^{-1}$), se realiza la medida cronoamperométrica aplicando un potencial de

-0.10 V vs Ag/AgCl, registrándose durante 200 s la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por el TMB. Una vez finalizada la medida, se quita el soporte móvil con los imanes y el chip se puede utilizar de nuevo tras un lavado con PBS.

3.3.4.2. Magnetoinmunosensores para la determinación del péptido natriurético cerebral N-terminal

En este apartado se describe la obtención de un magnetoinmunosensor amperométrico de tipo competitivo indirecto, basado en el empleo de HOOC-MBs, y en su activación con el sistema EDC/sulfo-NHS para inmovilizar covalentemente el NT-proBNP y así permitir una posterior competición con el NT-proBNP presente en disolución por los sitios de unión del anticuerpo de detección (antiNT-proBNP-HRP).

Activación y modificación de las HOOC-MBs: en un tubo eppendorf de 1.5 mL se resuspenden 3 μL de la suspensión comercial de MBs modificadas con grupos carboxilo en 50 μL de disolución MES de pH 5.0 y se lavan durante 10 min con agitación y a temperatura controlada (600 rpm, 25 °C). Transcurrido ese tiempo de lavado, las partículas se colocan en el concentrador durante 4 min y, posteriormente, se retira el sobrenadante, realizándose este procedimiento por duplicado. A continuación, las HOOC-MBs se incuban durante 35 min, manteniendo las mismas condiciones de agitación y temperatura, en 25 μL de una disolución de EDC/sulfo-NHS (50 mg mL^{-1}) preparada en MES 25 mM a pH 5.0, con objeto de activar los grupos carboxilo. Las partículas activadas se lavan dos veces con 50 μL de la misma disolución reguladora, imantando 4 min entre ambos lavados, y se incuban durante 60 min en 25 μL de una disolución de NT-proBNP (5 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en MES a pH 5.0. Transcurrido ese tiempo, las partículas modificadas se lavan dos veces con la disolución reguladora MES, manteniendo los mismos tiempos de imantación entre lavados. Posteriormente, se realiza la etapa de bloqueo de los grupos que hubiesen quedado sin modificar, incubando las partículas durante 60 min en 25 μL de una disolución de etanolamina 1 M preparada en TP 0.1 M a pH 8.0. Después de dos lavados con 25 μL de disolución Tris-HCl a pH 7.4 y un lavado con 50 μL de PBST a pH 7.5, las partículas modificadas se incuban durante 45 min en 25 μL de una disolución

mezcla (preparada en PBST) que contiene una concentración variable de NT-proBNP libre y una concentración fija de antiNT-proBNP-HRP ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esta mezcla se prepara previamente y se deja incubar en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. Por último, las partículas modificadas se lavan dos veces con 50 μL de PBST a pH 7.5 y se resuspenden en 45 μL de TP 0.1 M a pH 7.0.

Detección amperométrica: cada SPAuE, se conecta al potenciostato, situando un imán de neodimio bajo la superficie del electrodo de trabajo y, una vez depositados sobre la superficie electródica los 45 μL de la suspensión de MBs, se inicia el experimento electroquímico. Alcanzado el estado estacionario al potencial de medida (-0.1 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag), se adicionan 5 μL de la disolución comercial de TMB- H_2O_2 , produciéndose su reducción en presencia de HRP. Una vez finalizada la medida (transcurridos 200 s tras la adición del sustrato), se desconecta y se desecha el electrodo.

En la **Figura 22** se muestra el esquema del magnetoinmunosensor competitivo indirecto desarrollado para NT-proBNP.

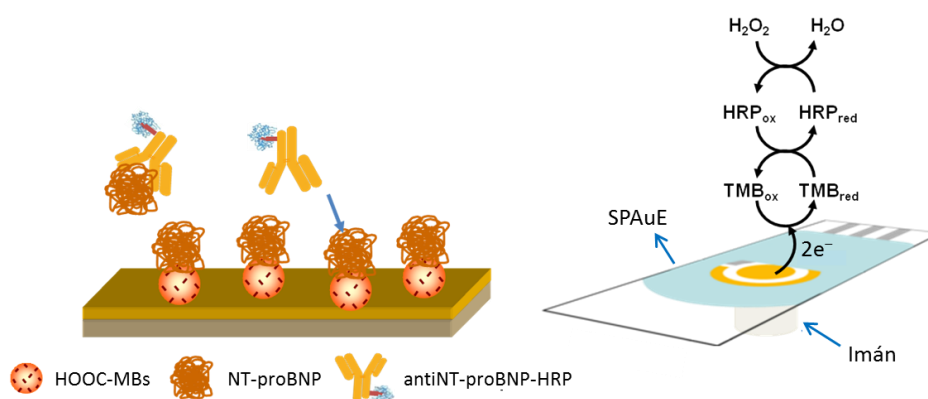


Figura 22. Esquema del magnetoinmunosensor desarrollado para NT-proBNP con detalle de las reacciones involucradas en la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por el TMB sobre la superficie electródica.

3.3.4.3. Magnetoinmunosensores para la determinación de la proteína C reactiva

Continuando con el empleo de HOOC-MBs como superficies de inmovilización, en este apartado se va a describir la obtención del inmunosensor amperométrico de CRP desarrollado en este trabajo, basado en un formato de inmunoensayo de tipo sándwich y en la activación de los grupos carboxilo mediante el empleo del sistema EDC/sulfo-NHS para permitir la inmovilización covalente del anticuerpo de captura.

Activación y modificación de las HOOC-MBs: en un tubo eppendorf de 1.5 mL se introducen 3 μL de la suspensión comercial de HOOC-MBs, se resuspenden en 50 μL de disolución MES 25 mM a pH 5.0 y se lavan durante 10 min con agitación y temperatura controlada (600 rpm, 25 °C). Transcurrido ese tiempo de lavado, las partículas se colocan 4 min en el concentrador y, posteriormente, se retira el sobrenadante, realizándose este procedimiento por duplicado. A continuación, se activan los grupos carboxilo incubando, en las mismas condiciones de agitación y temperatura, las HOOC-MBs durante 35 min en 25 μL de una disolución EDC/sulfo-NHS (50 mg mL⁻¹) preparada en disolución MES. A continuación, las partículas activadas se lavan dos veces con 50 μL de la misma disolución reguladora, imantando 4 min entre ambos lavados, y se incuban durante 60 min en 25 μL de la disolución de anticuerpo de captura (antiCRP, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Transcurrido ese tiempo, las partículas modificadas se lavan dos veces con la disolución MES y se realiza la etapa de bloqueo de los grupos que hubiesen quedado sin modificar, incubando las partículas durante 60 min en 25 μL de una disolución de etanolamina 1 M preparada en TP 0.1 M de pH 8.0. Después de dos lavados con 25 μL de disolución Tris-HCl a pH 7.2 y un lavado con 50 μL de PBST a pH 7.5, las partículas modificadas con el antiCRP se incuban durante 30 min en 25 μL de una disolución de concentración variable de CRP preparada en PBST (pH 7.5). Tras dos lavados con 50 μL de la misma disolución reguladora, las partículas se incuban durante 30 min en 25 μL de una disolución de biotin-antiCRP (1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en PBST (pH 7.5). Una vez realizados dos lavados con la misma disolución reguladora, las partículas se incuban durante 30 min en 25 μL de una disolución de un conjugado de Strp-HRP (1:1000) preparada en PBST (pH 7.5). Finalmente, las partículas modificadas

con el inmunoconjugado, se lavan dos veces con 50 μL de PBST (pH 7.5), y se resuspenden en 45 μL de TP 0.1 M a pH 7.0.

Detección amperométrica: La deposición de la suspensión de MBs modificadas sobre la superficie de los SPAuEs y la detección amperométrica del proceso de reducción del H_2O_2 mediado por el TMB, se realizan siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.4.2.

En la **Figura 23** se muestra el esquema del formato tipo sándwich del magnetoinmunosensor desarrollado para CRP.

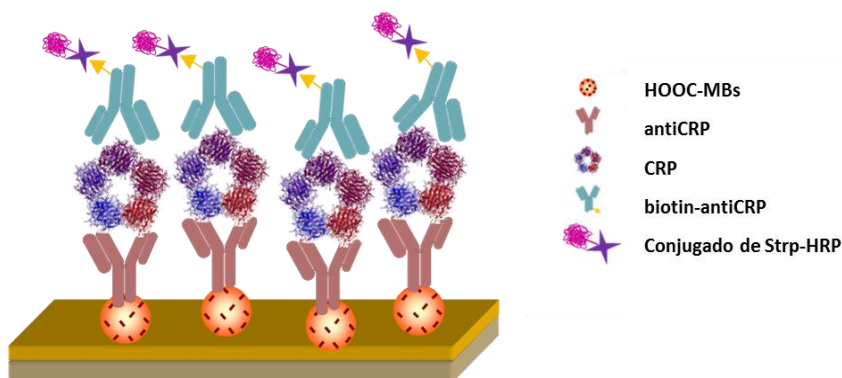


Figura 23. Esquema del formato de inmunoensayo empleado en el magnetoinmunosensor de CRP.

3.3.4.4. Magnetoinmunosensores duales para la determinación simultánea del péptido natriurético cerebral N-terminal y de la proteína C reactiva

En este apartado se describe la obtención del sensor dual desarrollado para detectar simultáneamente NT-proBNP y CRP en muestras de suero humano, aplicando formatos de inmunoensayo de tipo competitivo indirecto y sándwich, respectivamente, y empleando SPdCEs como superficies transductoras.

Modificación de las HOOC-MBs: 3 μL de la suspensión comercial de HOOC-MBs se llevan a un tubo eppendorf y se lavan dos veces con 50 μL de la disolución reguladora MES, durante 10 min bajo agitación continua (600 rpm, 25 $^{\circ}\text{C}$). Todos los

lavados consisten en la agitación en la disolución de lavado seguida de la concentración de las MBs durante 4 min y de la posterior retirada del sobrenadante. Los grupos carboxilo de las MBs se activan mediante incubación con 25 μL de una disolución de EDC/sulfo-NHS 50 mg mL^{-1} durante 35 min. Las MBs activadas se lavan dos veces con 50 μL de disolución MES y se incuban durante 60 min (600 rpm, 25 °C) en 25 μL de una disolución de antiCRP 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (antiCRP-MBs), o de NT-proBNP 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (NT-proBNP-MBs), ambas preparadas en disolución MES. Posteriormente, se realizan dos lavados con 50 μL de MES y los grupos activados que hayan quedado sin reaccionar se bloquean incubando en 25 μL de etanolamina 1 M (preparada en TP 0.1 M a pH 8.0) durante 60 min (600 rpm, 25 °C). Después de dos etapas de lavado con 50 μL de disolución Tris 0.1 M a pH 7.2 y otra con 50 μL de PBST a pH 7.5, las antiCRP-MBs se resuspenden en 25 μL de la disolución de la muestra (conteniendo los dos analitos) suplementada con biotin-antiCRP (1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y el conjugado de Strp-HRP (dilución 1:1000), mientras que las NT-proBNP-MBs se incuban en la disolución de la muestra (conteniendo los dos analitos) suplementada con antiNT-proBNP-HRP (1.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Para asegurar la eficiencia de las inmunoreacciones, las mezclas de reactivos se preparan 30 min antes, incubando posteriormente durante 45 min con las MBs modificadas (600 rpm, 25 °C). Por último, las MBs se lavan dos veces con 50 μL de PBST a pH 7.5, y se resuspenden en 5 μL de disolución TP 0.1 M a pH 7.0.

Detección amperométrica: el electrodo dual de carbono se conecta al detector amperométrico y, una vez colocados los imanes de neodimio bajo los dos electrodos de trabajo, se depositan 5 μL de la suspensión que contiene las NT-proBNP-MBs sobre el primer electrodo de trabajo y 5 μL de la suspensión que contiene las antiCRP-MBs sobre el segundo electrodo de trabajo. A continuación, se depositan 50 μL de la disolución comercial de TMB- H_2O_2 diluida 10 veces en TP 0.1 M a pH 7.0 sobre toda la superficie transductora y se inicia el experimento electroquímico, registrándose las dos intensidades de corriente durante 200 s a un potencial constante de -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Finalizada la medida, el electrodo se desconecta y desecha.

En la **Figura 24** se muestra un esquema general de los pasos realizados para llevar a cabo la obtención de sensor dual y detección de ambos biomarcadores cardíacos.



Figura 24. Esquema del magnetoinmunoensayo desarrollado para la detección simultánea de NT-proBNP y CRP, con detalle de la modificación de la superficie de las HOOC-MBs mediante la activación con el sistema EDC/sulfo-NHS y la posterior inmovilización covalente del antiCRP y del NT-proBNP.

3.3.4.5. Inmunosensores integrados para la determinación de lipoproteína-a

En este apartado se describe la preparación de un inmunosensor integrado amperométrico para la determinación de Lp(a), basado en una configuración de inmunoensayo tipo sándwich y en la inmovilización covalente con EDC y sulfo-NHS de un antiLp(a) en la superficie de electrodos serigrafiados de carbono previamente modificados con una capa densa de HS-NTA.

Formación de la capa de HS-NTA sobre los SPCEs: Para ello se depositan 10 µL de una disolución de HS-NTA 1.5 mM preparada en Na₂CO₃/NaHCO₃ 50 mM a pH 9.6 sobre la superficie del electrodo de trabajo y se incuba durante 2 h a 4 °C.

Inmovilización covalente del antiLp(a) sobre HS-NTA/SPCEs y construcción del inmunosensor: tras la formación de la capa de HS-NTA sobre la superficie electródica, los electrodos se enjuagan con agua desionizada y se secan bajo una corriente de nitrógeno. Con objeto de activar los grupos carboxilo y permitir la posterior unión covalente del anticuerpo de captura, sobre la superficie del electrodo modificado con HS-NTA se depositan 10 μL de una disolución de EDC/sulfo-NHS (50 mg mL^{-1}) preparada en MES 25 mM a pH 5.0. Tras un lavado con MES 25 mM a pH 5.0 y un secado bajo corriente de nitrógeno, se depositan 10 μL de una disolución de antiLp(a) (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$) preparada en la misma disolución reguladora del lavado previo, dejándose reaccionar durante 60 min. Tras la inmovilización del anticuerpo, el electrodo se lava con PBS 0.01 M a pH 7.5, para eliminar la cantidad de antiLp(a) no enlazada covalentemente. El siguiente paso consiste en llevar a cabo el bloqueo de los grupos residuales activos de la superficie (libre de antiLp(a)) para evitar posteriores adsorciones inespecíficas; para ello, se depositan 10 μL de una disolución de leche semidesnatada diluida a la mitad con PBS 0.01 M a pH 7.5 y se incubaba durante 30 min. Al mismo tiempo que se realiza la etapa de bloqueo, se prepara una disolución mezcla de una concentración variable de Lp(a), y una concentración fija del anticuerpo específico de detección biotinilado (biotin-antiLp(a), 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y del conjugado de Strp-HRP (1:1000), en PBST 0.01 M a pH 7.5, y se dejaba reaccionar durante 30 min. Tras lavar el antiLp(a)-SPCE con PBS 0.01 M a pH 7.5 y secarlo, se depositan 10 μL de la mezcla anterior y se incuba durante 15 min. Por último, cada electrodo se lava con TP 0.1 M a pH 7.0 y se seca. Todos los procesos de modificación se llevan a cabo a temperatura ambiente manteniendo el SPCE en una cámara de incubación húmeda para evitar la evaporación de las gotas depositadas en la superficie del electrodo de trabajo.

Detección electroquímica: cada SPCE modificado se conecta al potencióstato y, una vez depositados 45 μL de TP 0.1 M a pH 7.0 sobre la superficie electródica modificada, se inicia el experimento electroquímico aplicando un potencial de -0.1 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Alcanzado el estado estacionario, se adicionan 5 μL de la disolución comercial de TMB- H_2O_2 , produciéndose su reducción en

presencia de HRP. Una vez finalizada la medida (transcurridos 200 s tras la adición del sustrato), se desconecta y se desecha cada electrodo.

En la **Figura 25** se muestra un esquema del del inmunosensor integrado para la determinación de Lp(a) incluyendo el detalle de las reacciones involucradas en la inmovilización del anticuerpo y la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por el TMB sobre la superficie electródica.

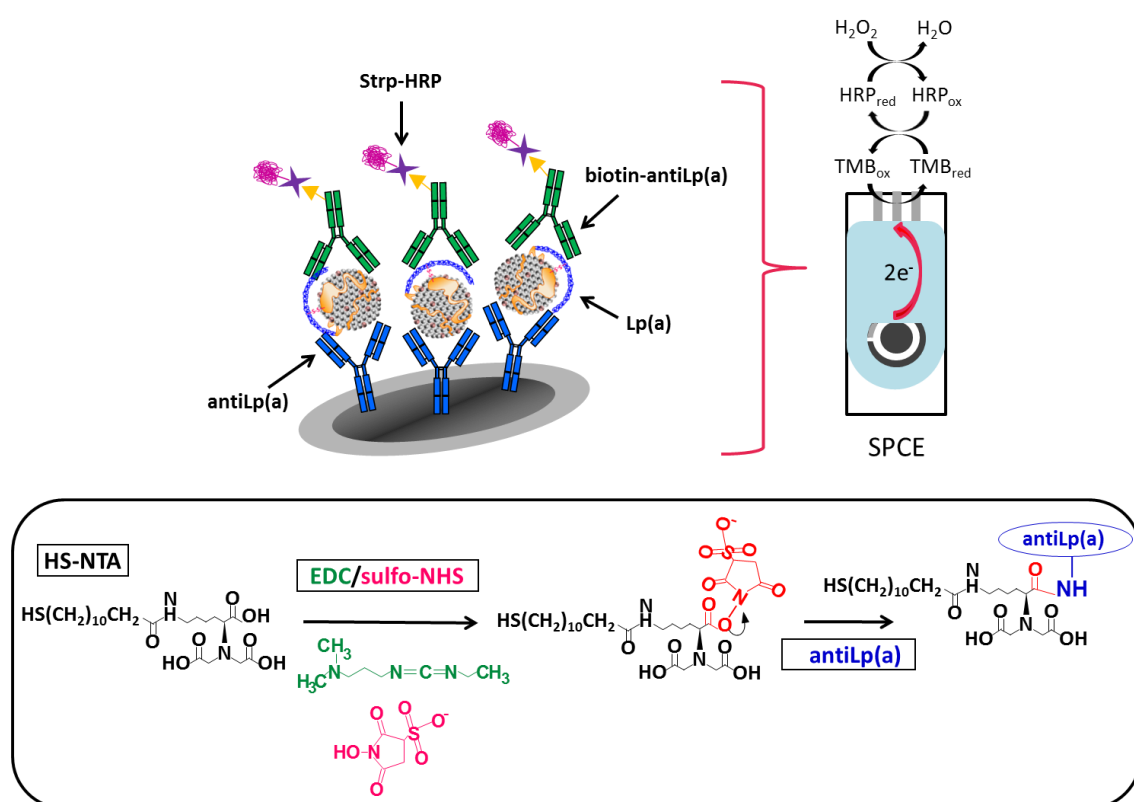


Figura 25. Esquema del inmunosensor integrado de Lp(a), con detalle de la modificación de la superficie de los SPCEs con la capa densa de HS-NTA, la activación con el sistema EDC/sulfo-NHS y la inmovilización covalente del antiLp(a), así como de las reacciones involucradas en la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por el TMB sobre la superficie electródica.

3.3.5. PREPARACIÓN DE GENOSENSORES DE SUPERFICIE

En este apartado se describe el desarrollo de un modelo de sensor electroquímico de DNA empleando electrodos serigrafiados con pasta de oro fabricados en los laboratorios del Departamento de Ciencia y Tecnología Química de la

Facultad de Ciencias de la Universidad Tor Vergata de Roma (descritos en el Apdo. 3.1.2).

Fabricación del genosensor: el primer paso para la fabricación del sensor consiste en la inmovilización de la sonda de captura sobre la superficie electródica. Para ello, la sonda se reduce previamente durante 1 h, mezclando 1 μL de la sonda de captura (200 μM), modificada covalentemente en su extremo 3' con el marcador redox MB y en su extremo 5' con un grupo alcanotiol, con 2 μL de una disolución de TCEP 10 mM. La presencia del grupo alcanotiol permite la unión de la sonda a la superficie de oro mediante la formación de una monocapa autoensamblada. Para ello, se depositan 20 μL de la disolución de sonda de captura (preparada en disolución reguladora TP 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7.0) y se deja incubar durante 60 min. Tanto la reducción como la inmovilización de la sonda sobre la superficie electródica se realizan a temperatura ambiente y en la oscuridad, debido a la fotosensibilidad del marcador redox empleado. Los electrodos modificados se lavan con agua desionizada para retirar el exceso de sonda que hubiese quedado sin inmovilizar. Seguidamente, se depositan 20 μL de una disolución de 6-mercapto-1-hexanol 2 mM (preparada en la misma disolución reguladora), con objeto de evitar adsorciones inespecíficas y de orientar la sonda de captura para asegurar una óptima eficiencia de hibridación. Se deja incubar durante 90 min y, posteriormente, se retira el exceso con agua desionizada. Finalmente, los electrodos modificados se conservan durante 30 min en 70 μL de disolución reguladora antes de ser utilizados.

Detección electroquímica del proceso de hibridación: las medidas electroquímicas se realizan mediante SWV aplicando un barrido de potencial de -0.4 a -0.05 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag (25 mV, 50 Hz). Las medidas se registran en disolución reguladora (TP 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7.0) cada 5 min, hasta que la corriente de pico se estabiliza (normalmente transcurridos 30 min). Posteriormente, cada SPAuE se incuba durante 60 min con 70 μL de las correspondientes disoluciones de DNA diana de diferente concentración y, transcurrido el tiempo de hibridación, se registran las medidas electroquímicas correspondientes. Al producirse la hibridación entre la sonda de captura y el DNA

diana, se dificulta la transferencia electrónica entre el MB y la superficie del electrodo, provocando una disminución en la intensidad de pico. Así, la relación de intensidad medida entre la corriente de pico obtenida en ausencia y presencia de DNA diana, permite obtener el % de supresión de señal producido. Los % de supresión de señal se normalizaron respecto a una escala de 0 a 100 para una interpretación más sencilla de los resultados.

En la **Figura 26** se muestra el esquema del sensor de DNA desarrollado y la respuesta electroquímica obtenida tras el proceso de hibridación con la secuencia de DNA complementaria.

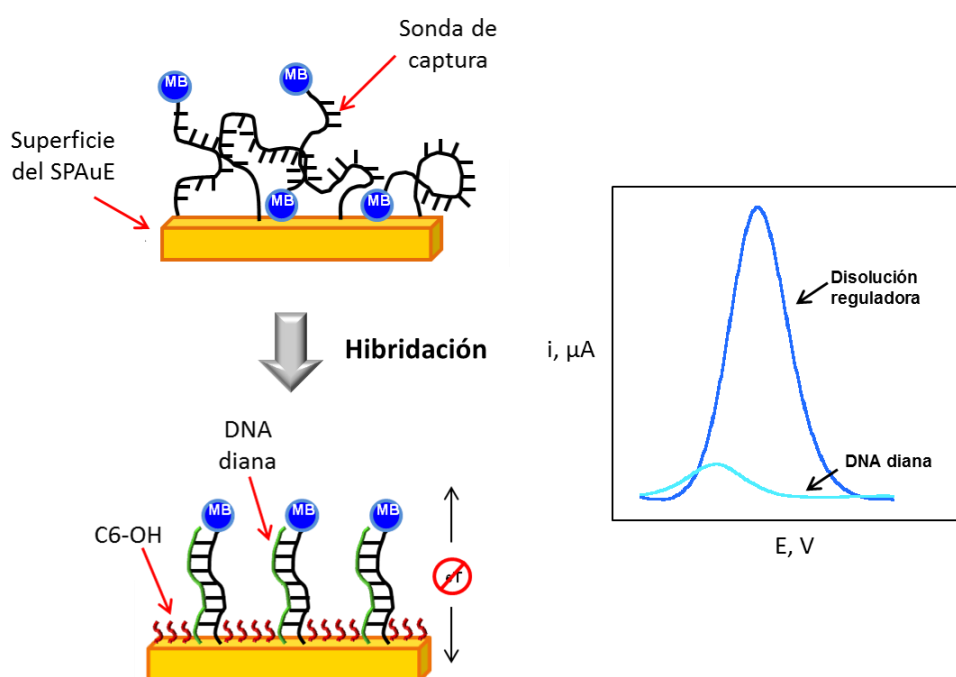


Figura 26. Esquema del genosensor de superficie desarrollado con detalle de la medida electroquímica del proceso de hibridación con la secuencia de DNA complementaria.

Cálculo de la densidad de sonda de captura: la densidad de sonda de captura inmovilizada sobre la superficie de los SPAuEs (expresada como el número de moles de DNA inmovilizados por unidad de área) se calcula mediante cronoculombimetría, empleando un método descrito anteriormente basado en la medida de la reducción del cloruro de hexaminorutenio (III) ([Lao, 2005], [Steel, 1998]). Antes de realizar la medida, los electrodos modificados con disoluciones de concentraciones variables de la sonda de captura (0.01–2 μM), se sumergen durante 10 min en una disolución Tris 10 mM a pH 7.4 o en una disolución de hexaminorutenio (III) 0.2 mM (preparada en la

misma disolución reguladora), aplicando posteriormente dos pasos de potencial de 0.1 a -0.4 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag.

3.3.6. ANÁLISIS DE MUESTRAS

La validez de los métodos desarrollados se ha confirmado llevando a cabo la determinación de los diferentes analitos biológicos descritos anteriormente en muestras de distinta naturaleza, demostrando así su potencial aplicabilidad en el análisis clínico.

3.3.6.1. Determinación de *Streptococcus pneumoniae* en muestras de orina

El análisis de muestras de orina humana inoculadas con concentraciones de *S. pneumoniae* comprendidas entre 5.0×10^4 y 1.0×10^7 cfu mL⁻¹ se lleva a cabo tomando alícuotas de 200 µL y siguiendo la metodología descrita en el Apdo. 3.3.2.1.

Tras comprobar la ausencia de efecto matriz realizando calibrados de distintas cepas de la bacteria en orina, la determinación de *S. pneumoniae* en las muestras inoculadas se realiza por interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para dichas muestras en el calibrado obtenido con disoluciones estándar.

3.3.6.2. Determinación de *Staphylococcus aureus* en muestras de leche

Para este análisis se emplean muestras de leche semidesnatada inoculadas a dos niveles de concentración (10 y 100 cfu mL⁻¹). Las muestras de leche enriquecidas se someten a un tratamiento con ultrasonidos durante 30 min para conseguir la lisis celular de la pared bacteriana. Se realiza un calibrado de *S. aureus* en leche (siguiendo el procedimiento experimental descrito en el Apdo. 3.3.3) y la cantidad de bacteria presente en las muestras se determina mediante interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas en la ecuación del calibrado preparado en leche.

3.3.6.3. Determinación de troponina T cardiaca en suero humano

Estos análisis se han llevado a cabo empleando dos superficies transductoras diferentes:

a) Electrodos serigrafiados comerciales

La determinación del contenido de cTnT en muestras de suero humano enriquecido se lleva a cabo aplicando un procedimiento experimental basado en la formación del inmunocomplejo tipo sándwich en una etapa previa a la incubación con las Strp-MBs (**Figura 27**).

Tras diluir la muestra 50 veces con PBS a pH 7.5, se añaden tanto el biotin-anticTnT ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$) como el anticTnT-HRP ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la mezcla de reacción se incuba en un tubo eppendorf durante 90 min (600 rpm, 37°C). Pasado el tiempo de inmunoreacción, 100 μL de dicha mezcla se incuban durante 30 min con 5 μL de Strp-MBs (600 rpm, 37°C). Las MBs resultantes, se lavan, resuspenden y depositan sobre la superficie de los SPAuEs siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.4.1.

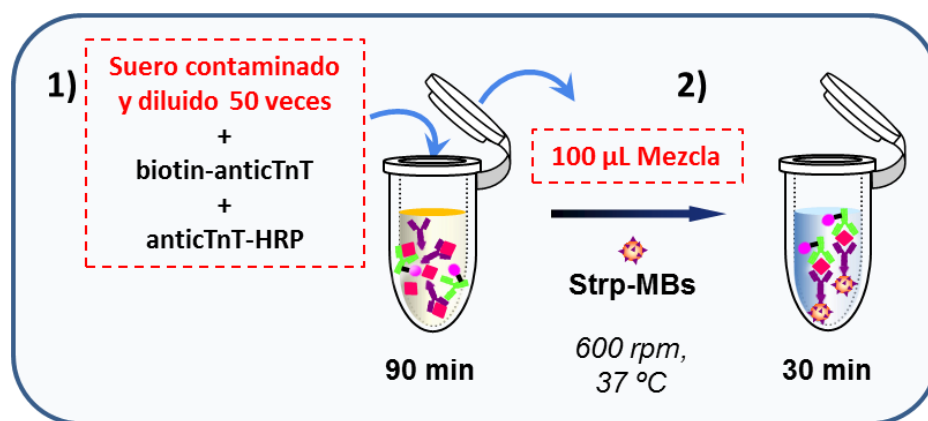


Figura 27. Procedimiento experimental seguido para la determinación de cTnT en muestras de suero humano enriquecidas empleando el magnetoinmunosensor desarrollado: 1) Incubación del suero (contaminado y diluido) con el biotin-anticTnT y el anticTnT-HRP; 2) Incubación de la mezcla de reacción con las Strp-MBs.

El suero reconstituido en PBS 0.01 M a pH 7.5 y enriquecido con 20 ng mL^{-1} de cTnT, se diluye 50 veces, nivel al que se comprobó la ausencia de efecto matriz, quedando una concentración final en la mezcla de reacción de 0.40 ng mL^{-1} de cTnT. La determinación de cTnT se realiza a continuación mediante interpolación de las

intensidades de corriente obtenidas para el suero enriquecido y diluido en el calibrado obtenido con disoluciones patrón.

b) Chip de microfluídica

El chip de microfluídica descrito en el Apdo. 3.1.2 se ha empleado para llevar a cabo la determinación de cTnT en muestras de suero humano enriquecidas con 50 ng mL⁻¹ de esta proteína y sin enriquecer que, posteriormente, se diluyen 50 veces con PBS a pH 7.5. Para ello, se sigue el procedimiento experimental descrito para los electrodos serigrafiados comerciales y, una vez modificadas, las MBs se resuspenden en 500 µL de la misma disolución reguladora y se introducen en la plataforma de medida siguiendo el procedimiento descrito para las disoluciones patrón (Apdo. 3.3.4.1.2).

3.3.6.4. Determinación del péptido natriurético cerebral N-terminal en suero humano

En este caso se ha llevado a cabo el análisis de un suero humano enriquecido con NT-proBNP. La muestra de suero liofilizada, se reconstituye en PBST 0.01 M a pH 7.5 y se diluye 10 veces con la misma disolución reguladora, contaminándola posteriormente a tres niveles de concentración de NT-proBNP (en concreto, 0.10, 0.50 y 2.0 ng mL⁻¹).

La determinación de NT-proBNP en la muestra de suero, se llevó a cabo mediante la interpolación de las intensidades de corriente obtenidas para cada muestra enriquecida a los tres niveles de concentración, en un calibrado de NT-proBNP construido en dicho suero diluido 10 veces. Para construir el calibrado, a la muestra de suero diluida 10 veces en PBST a pH 7.5 se le añaden concentraciones crecientes de NT-proBNP, entre 0.01 y 5×10³ ng mL⁻¹. Para asegurar una mezcla adecuada del antígeno y el suero se utiliza un vortex. Las MBs modificadas con NT-proBNP, siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.4.2, se resuspenden en una alícuota de 25 µL de una mezcla que contiene la muestra de suero contaminado diluida y 1 µg mL⁻¹ de HRP-antiNT-proBNP y se incuba a 25 °C durante 45 min con agitación vigorosa (600 rpm). Las MBs resultantes se lavan, resuspenden y capturan magnéticamente en la

superficie del electrodo siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.4.2 para disoluciones patrón de NT-proBNP.

3.3.6.5. Determinación de proteína C reactiva en un material de referencia

El magnetoinmunosensor se ha empleado para el análisis de una muestra de suero humano con un contenido certificado de CRP ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$). Para ello, el suero reconstituido en PBST (pH 7.5) se diluye 1000 veces, se toman $25 \mu\text{L}$ y se incuba con las partículas magnéticas previamente modificadas con el antiCRP y bloqueadas con etanolamina (manteniendo las condiciones experimentales descritas en el Apdo. 3.3.4.3).

La ausencia de efecto matriz se comprobó realizando un calibrado en el suero diluido en PBST (pH 7.5) hasta un contenido final de 5 ng mL^{-1} de CRP, por adición de concentraciones crecientes de dicho analito hasta un valor de $1 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$. En consecuencia, la determinación del contenido de CRP en la muestra certificada se llevó a cabo interpolando el valor de intensidad de corriente obtenida para cada muestra diluida en el calibrado construido con disoluciones patrón de la proteína.

3.3.6.6. Determinación simultánea del péptido natriurético cerebral N-terminal y de la proteína C reactiva en un material de referencia

Para demostrar la aplicabilidad del magnetoinmunosensor dual, se analizó un material de referencia con un contenido certificado de CRP que se enriqueció con NT-proBNP. La muestra reconstituida ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) se diluyó 100 veces con PBST a pH 7.5. y se contaminó con 1 ng mL^{-1} de NT-proBNP. La determinación simultánea de ambos marcadores cardíacos se lleva a cabo aplicando una dilución 1/10 adicional, empleando la misma disolución reguladora.

Las antiCRP-MBs y las NT-proBNP-MBs (preparadas de la forma descrita en el Apdo. 3.3.4.4) se incuban durante 45 min en $25 \mu\text{L}$ del suero diluido 10 veces, conteniendo los dos analitos y suplementado con biotin-antiCRP ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) y el conjugado de Strp-HRP (dilución 1:1000) para la determinación de CRP, o con el antiNT-proBNP-HRP ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) para la determinación del NT-proBNP. Las etapas de

lavado, la resuspensión de las MBs y la detección electroquímica se realizan siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.4.4.

Las concentraciones de CRP y NT-proBNP en la muestra se determinan mediante interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para cada analito en el calibrado de CRP obtenido con disoluciones patrón o en el calibrado de NT-proBNP realizado en la muestra diluida 10 veces, respectivamente.

3.3.6.7. Determinación de lipoproteína-a en suero humano

La validación del inmunosensor desarrollado se ha llevado a cabo determinando la concentración de Lp(a) en dos muestras de suero humano, una enriquecida con $200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ($20\ \text{mg dL}^{-1}$) de Lp(a) y otra con un contenido certificado de Lp(a) de $561\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ($56.1\ \text{mg dL}^{-1}$).

Se ha construido un calibrado de Lp(a) en la muestra de suero enriquecida añadiendo concentraciones de Lp(a) en el intervalo de 1 a $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$ a las muestras diluidas 40 veces con PBST $0.01\ \text{mol L}^{-1}$ a pH 7.5. Para asegurar una mezcla adecuada del antígeno en el suero se utiliza un vortex. A continuación, se depositan $10\ \mu\text{L}$ de la muestra diluida contaminada y mezclada con biotin-antiLp(a) y Strp-HRP ($2\ \mu\text{g mL}^{-1}$ y 1:1000, respectivamente) en los SPCEs modificados con anti-Lp(a), siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.4.5, y se incuba 15 min a $25\ ^\circ\text{C}$. Seguidamente, los SPCEs modificados se lavan siguiendo el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.4.5 para disoluciones patrón de Lp(a) y se procede a la medida amperométrica. Tras comprobar la ausencia de efecto matriz, la determinación de Lp(a) en las muestras enriquecidas se lleva a cabo, tras su dilución hasta una concentración final de $5.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a), siguiendo el mismo procedimiento e interpolando el valor de la intensidad de corriente obtenida para cada muestra en el calibrado de Lp(a) construido con disoluciones patrón de la proteína.

Por lo que se refiere a la muestra certificada, la ausencia de efecto matriz se comprobó construyendo una recta de calibrado a partir de la muestra diluida con PBST hasta una concentración final de Lp(a) de $0.561\ \mu\text{g mL}^{-1}$ y añadiendo concentraciones crecientes de la proteína hasta un valor de $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$. La determinación de Lp(a) se

lleva a cabo tras diluir la muestra 100 veces con PBST a pH 7.5 siguiendo el procedimiento descrito para la muestra de suero enriquecido con la proteína.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta el creciente interés en el diseño y desarrollo de biosensores para su implementación en el análisis clínico de rutina, y descritas las ventajas que ofrecen en este campo las técnicas electroquímicas, en esta Tesis Doctoral se han desarrollado varios inmunosensores y genosensores electroquímicos para la detección de diferentes analitos de interés biológico, entre los que se encuentran ciertas bacterias de relevancia en los campos clínicos y agroalimentario, y biomarcadores de enfermedades cardiovasculares de relevancia en diagnóstico clínico.

Las MBs se han empleado como plataformas de inmovilización en la mayoría de los biosensores descritos, ya que poseen una elevada área superficial disponible para la unión de diversos elementos de reconocimiento y una gran versatilidad de funcionalizaciones que permite la inmovilización covalente, reproducible y estable de antígenos proteicos y orientada de anticuerpos. Por otra parte, su sencilla manipulación y modificación, basada en el uso de un imán de neodimio, facilita en gran medida la preparación del biosensor.

Además, en todos los casos se han empleado SPEs como superficies transductoras, que ofrecen interesantes ventajas por su carácter desechable, fácil uso, posibilidad de producción en masa y por el pequeño volumen de muestra que requieren, lo que abarata mucho el coste del análisis.

A continuación, se van a describir los resultados obtenidos en cada uno de los trabajos recogidos en esta Memoria, agrupados según un esquema general que engloba las siguientes etapas comunes en el desarrollo de todos los biosensores implementados: elección de los elementos de reconocimiento y diseño del tipo de configuración del ensayo, optimización de las variables experimentales, evaluación de las características analíticas, estudios de selectividad y estabilidad y aplicación al análisis de muestras.

4.1. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE *Streptococcus pneumoniae*

Como se ha explicado en capítulos anteriores (Apdo. 2.5.1.), el *S. pneumoniae* es uno de principales microorganismos patógenos, siendo el causante de un gran número de infecciones y procesos invasivos severos, por lo que su determinación adquiere un papel muy importante en el diagnóstico clínico.

Particularmente, los inmunosensores y genosensores resultan muy atractivos como métodos de determinación de dicho patógeno, debido a su sencillez, sensibilidad, selectividad y bajo coste y posibilidad de miniaturización de la instrumentación requerida.

A continuación se describirán los resultados más relevantes obtenidos en las metodologías desarrolladas para la determinación de neumococo. Cabe destacar que estas investigaciones se han realizado en colaboración con los Investigadores Ernesto García y Pedro García del Centro de Investigaciones Biológicas del CSIC.

4.1.1. DESARROLLO DE MAGNETOINMUNOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE *Streptococcus pneumoniae*

En la Parte Experimental se ha descrito el procedimiento de fabricación del magnetoinmunosensor para *S. pneumoniae* (Apdo. 3.3.2.1.), basado en el empleo de ProtA-MBs, un formato tipo sándwich, la enzima peroxidasa como marcador enzimático y SPAuEs como superficies electródicas.

A modo de resumen, tras la inmovilización del anticuerpo de captura (antiS37) sobre la superficie de las ProtA-MBs, se realizaba una incubación con la bacteria, seguida del marcaje con un anticuerpo de detección (antiS37-HRP). Las MBs resultantes se capturaban magnéticamente sobre la superficie de los SPAuEs previamente modificada con TTF (actuando únicamente el electrodo como transductor de la reacción inmunológica) y, finalmente, se detectaba el proceso de reducción

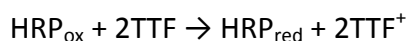
amperométrica del H₂O₂ en presencia de HRP, aplicando un potencial de -0.15 V (vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag).

La HRP es una enzima oxidorreductasa, que cataliza reacciones bisustrato de carácter redox, siendo el H₂O₂ su sustrato. Se caracteriza por su gran estabilidad, facilidad de conjugación con las inmunoglobulinas y por la sencillez para poder detectarla por métodos colorimétricos, utilizando un gran número de reactivos. Por su parte, el TTF empleado como mediador redox, fue seleccionado previamente en el Grupo de Investigación entre varios compuestos porque proporcionaba una mayor eficiencia en la transferencia electrónica entre el centro activo de la enzima y el electrodo.

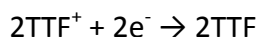
Así, las reacciones implicadas en la detección amperométrica del *S. pneumoniae*, consistían en la reducción del H₂O₂ por la forma reducida de la HRP:



al mismo tiempo que el TTF donaba electrones a la HRP en presencia de H₂O₂:



y el reciclaje catódico del TTF⁺ resultante a TTF, empleando esta última reacción electroquímica para monitorizar la reacción global:



Una vez explicado el fundamento del magnetoinmunosensor de *S. pneumoniae*, se van a describir los resultados más relevantes correspondientes a los estudios de optimización, de características analíticas y de aplicación al análisis de muestras de orina inoculadas.

4.1.1.1. Elección del tipo de anticuerpo

En primer lugar y con objeto de desarrollar un biosensor lo más sensible y selectivo posible, se realizó un estudio para la elección del anticuerpo de captura, para lo que se comparó mediante citometría de flujo el reconocimiento de la bacteria por siete tipos de anticuerpos. Como puede observarse en la **Figura 28**, los resultados obtenidos confirmaron una buena selectividad frente a los estreptococos no neumocócicos y bacterias ensayadas (representados por diferentes colores) de los cuatro anticuerpos anticapsulares estudiados (ab20429, antiS37, antiR y PA1-7259), con la excepción del PA1-7259, que presentó una elevada reactividad cruzada con *E. coli*. Por el contrario, la selectividad obtenida hacia el neumococo resultó bastante inferior con los anticuerpos antismáticos (antiPLY, antiTEPC15 y antiCLytA).

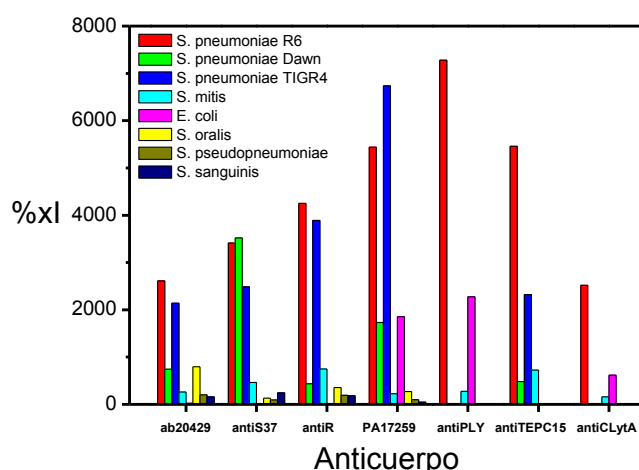


Figura 28. Producto del porcentaje de población positiva y la intensidad de fluorescencia obtenidos con cada bacteria ensayada para cada anticuerpo.

En vista a estos resultados, se seleccionó el antiS37 como anticuerpo modelo, ya que permitía determinar con una buena sensibilidad y selectividad serotipos capsulados y no capsulados de *S. pneumoniae* en presencia de otros estreptococos y de otras bacterias no filogenéticamente relacionadas.

4.1.1.2. Elección del tipo de configuración

Todos los estudios de optimización realizados se llevaron a cabo comparando la relación obtenida entre las señales amperométricas específicas (obtenidas en presencia de *S. pneumoniae* de la cepa Dawn en concentración 1.0×10^7 cfu mL⁻¹) y no específicas (en ausencia de la bacteria).

Se ensayaron tres tipos de configuraciones de inmunoensayo de tipo sándwich, que se muestran esquemáticamente en la **Figura 29**. Dichas configuraciones se basaban en el empleo de un anticuerpo de detección marcado con HRP (estrategia 1), de un anticuerpo de detección biotinilado y un polímero comercial de Strp-HRP (estrategia 2) y de un anticuerpo de detección biotinilado, el polímero comercial de Strp-HRP y un anticuerpo antiStrp también biotinilado (estrategia 3).

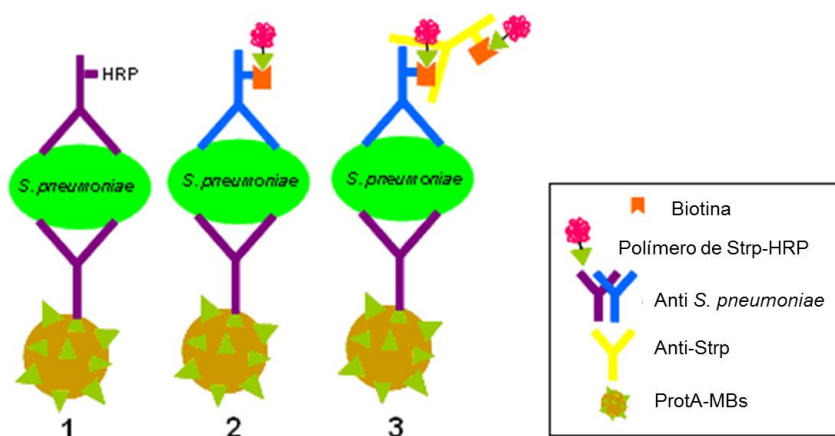


Figura 29. Representación esquemática de las tres configuraciones de inmunoensayo estudiadas.

A pesar de que las respuestas obtenidas en presencia de bacteria fueron similares con las configuraciones 1 y 2, se observaron mayores señales en ausencia de bacteria en la segunda configuración (**Figura 30**), lo que puede atribuirse a adsorciones inespecíficas del polímero de Strp-HRP. Como consecuencia, la relación observada entre la señal amperométrica obtenida en presencia y en ausencia de bacteria era mucho mayor en el caso de la configuración 1. Como puede observarse, con la tercera configuración las señales amperométricas obtenidas en presencia de bacteria fueron inferiores, lo que puede atribuirse a la disociación del anticuerpo biotinilado anti-Strp

de la capa inicial de polímero de Strp-HRP, como resultado de la competición con la segunda capa [Anderson, 2008], [Kim, 2009]. Atendiendo a dichos resultados, se eligió la estrategia 1 para realizar los estudios posteriores, ya que proporcionó la mejor relación entre las señales específicas y no específicas y, además, permitía abaratar los costes y reducir el tiempo de ensayo.

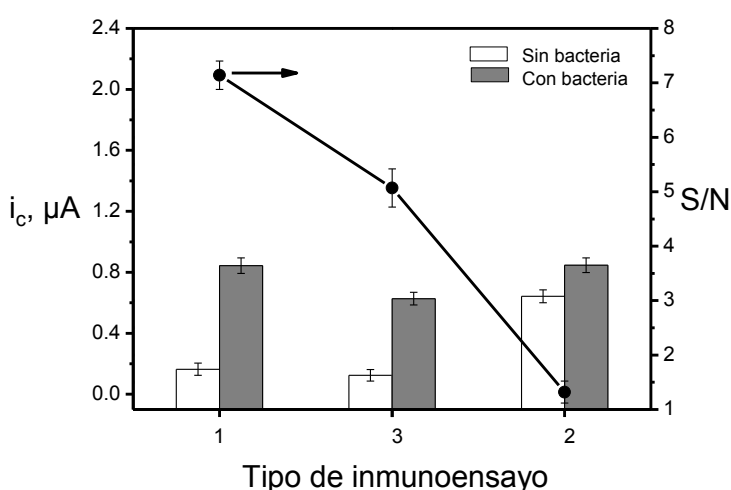


Figura 30. Influencia de la configuración del inmunoensayo sobre las señales amperométricas obtenidas en presencia y en ausencia de bacteria y sobre las relaciones correspondientes obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas. Condiciones experimentales: ProtA-MBs= 10 μL (30 $mg mL^{-1}$); [antiS37] y [antiS37-HRP] = 20 $\mu g mL^{-1}$; [Strp-HRP] = 10 $\mu g mL^{-1}$; [*S. pneumoniae* cepa Dawn] = 1.0×10^7 cfu mL^{-1} ; t_{inc} = 60 min; E_{app} = -0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error estimadas como el triple de la desviación estándar ($n = 3$).

4.1.1.3. Optimización de variables experimentales

Una vez seleccionados los anticuerpos y el tipo de configuración de inmunoensayo, se estudiaron las variables experimentales que afectaban a la fabricación del magnetoinmunosensor amperométrico de *S. pneumoniae*, cuyos resultados se comentarán a continuación.

Concentración de los anticuerpos de captura y de detección

La cantidad de anticuerpo inmovilizado sobre las MBs adquiere una gran importancia en la preparación del magnetoinmunosensor, ya que influye

decisivamente en las características analíticas del método, principalmente en relación con la sensibilidad y el intervalo de linealidad alcanzables.

Con el fin de optimizar esta variable, se estudió la dependencia de las respuestas amperométricas proporcionadas por el magnetosensor con la concentración de la disolución del anticuerpo de captura (antiS37) empleada para modificar las MBs, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 0 y 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tal y como puede observarse en la **Figura 31a**, en ausencia de anticuerpo de captura se observaron señales inespecíficas elevadas, debido a la inmovilización del anticuerpo de detección sobre las ProtA-MBs. El aumento de la concentración de anticuerpo de captura hasta un valor de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, producía una disminución de las señales inespecíficas, confirmando que en estas condiciones el antiS37-HRP sólo se unía en presencia de la bacteria inmovilizada al anticuerpo de captura puesto que no hay grupos de ProtA libres donde pueda enlazarse en ausencia de bacteria. Sin embargo, al aumentar la concentración de la disolución de antiS37 por encima de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se observaba una disminución de las señales específicas, debido probablemente a que el exceso de anticuerpo de captura sobre las MBs obstaculizaba la reacción de biorreconocimiento de la bacteria por impedimento estérico.

Teniendo en cuenta que la mejor relación entre las señales específicas e inespecíficas se obtuvo trabajando con disoluciones de antiS37 de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, se seleccionó esta concentración para trabajar en estudios posteriores.

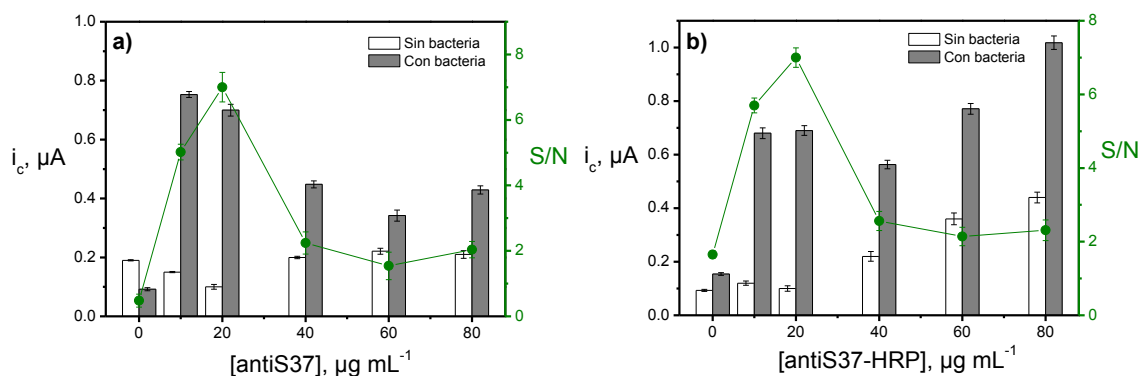


Figura 31. Dependencia de las intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en ausencia y presencia de disolución bacteriana (*S. pseudopneumoniae* Dawn 1.0×10^7 cfu mL⁻¹) con la concentración de las disoluciones de anticuerpo de captura (antiS37) a) y anticuerpo de detección (antiS37-HRP) b) y representación de las relaciones obtenidas entre las señales específicas e inespecíficas (S/N). Mismas condiciones experimentales de la Figura 30. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

De la misma forma, se estudió la influencia de la concentración del anticuerpo de detección (antiS37-HRP) (**Figura 31b**). Como era de esperar, la respuesta obtenida en ausencia de anticuerpo fue despreciable, al no producirse reducción electrocatalítica del H₂O₂ sobre la superficie de los TTF-SPAUEs en ausencia de marcador enzimático. En general, aunque a partir de 60 µg mL⁻¹ aumentan las señales específicas, también lo hacen las inespecíficas a partir de 40 µg mL⁻¹, por lo que se eligió una concentración de 20 µg mL⁻¹ para continuar trabajando.

Tiempos de incubación

También se estudió la influencia de los tiempos de todas las etapas de incubación con las distintas disoluciones de anticuerpos y antígeno. En el caso de los anticuerpos, se estudió el tiempo de incubación en el intervalo comprendido entre 15 y 90 min, manteniendo fijo el tiempo de incubación con la disolución bacteriana (*S. pneumoniae* Dawn 1.0×10^7 cfu mL⁻¹) en 1 h. Como puede observarse en la **Figura 32a**, en la que se muestran los resultados obtenidos en el estudio del tiempo de incubación del anticuerpo de captura, la relación de señales más favorable se observó para un tiempo de incubación de 1 h. Dado que en el estudio del efecto que el tiempo de incubación del anticuerpo de detección ejerce sobre las señales obtenidas se obtuvo

un comportamiento similar (no mostrado), se seleccionó este tiempo para llevar a cabo las etapas de incubación con las disoluciones de ambos anticuerpos.

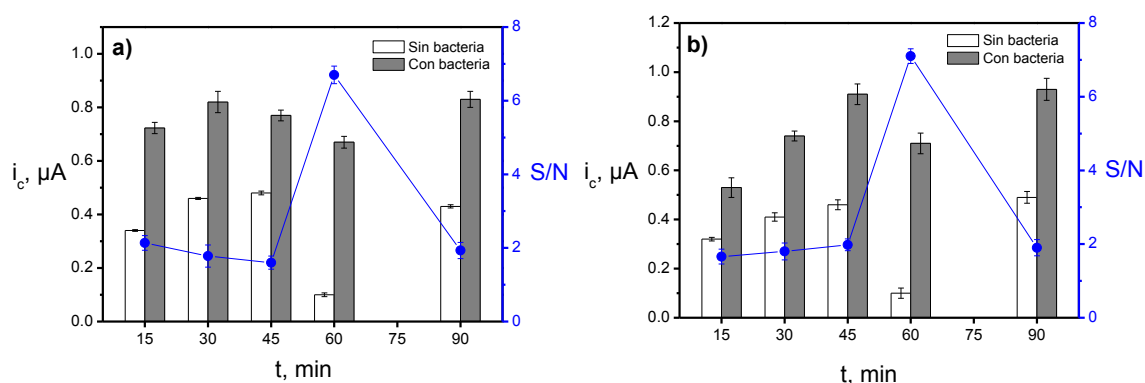


Figura 32. Dependencia de las intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en ausencia y presencia de disolución bacteriana (*S. pseudopneumoniae* Dawn 1.0×10^7 cfu mL⁻¹) con el tiempo de incubación en la disolución de antiS37 manteniendo fijos los tiempos de incubación en la disolución bacteriana y del antiS37-HRP en 1 h a); y en la disolución bacteriana manteniendo fijos los tiempos de incubación de los anticuerpos en 1 h b) y representación de las relaciones S/N. Condiciones experimentales: ProtA-MBs= 10 μ L (30 mg mL⁻¹); [antiS37] y [antiS37-HRP] = 20 μ g mL⁻¹; [Strp-HRP] = 10 μ g mL⁻¹; E_{app} = -0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a 3 \times s (n = 3).

En cuanto al tiempo de incubación en la disolución bacteriana, estudiado en el mismo rango y manteniendo fijo el tiempo de incubación de ambos anticuerpos en 60 min, también se observó la mejor relación entre señales específicas e inespecíficas con un tiempo de incubación de 1 h (**Figura 32b**), por lo que fue seleccionado para llevar a cabo estudios posteriores.

Es importante destacar que, aunque con menor sensibilidad, es posible llevar a cabo la determinación de *S. pneumoniae* con el magentoinmunosensor desarrollado en tan sólo 90 min trabajando con tiempos de incubación de 30 min en vez de los 60 min elegidos.

Volumen de incubación de las disoluciones

Finalmente se realizó un estudio de los volúmenes de las disoluciones de incubación, variando en primer lugar el volumen de las disoluciones de los anticuerpos, en el intervalo comprendido entre 25 y 200 μL , y manteniendo fijo en 200 μL el volumen de incubación de la disolución bacteriana. Como queda reflejado en la **Figura 33**, donde se muestran únicamente los resultados obtenidos en el estudio del volumen de la disolución del anticuerpo de detección, la mejor relación de señales se obtuvo trabajando con un volumen de las disoluciones de incubación de los dos anticuerpos de 100 μL , por lo que se seleccionó este volumen para estudios posteriores.

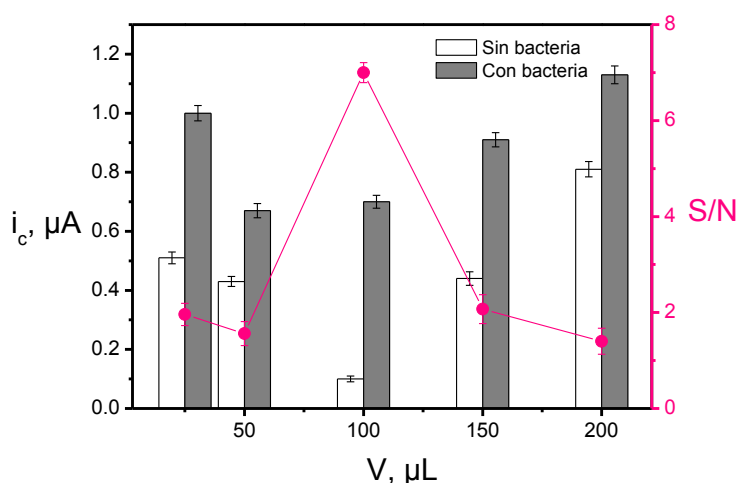


Figura 33. Dependencia de las intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en ausencia y presencia de disolución bacteriana (*S. pseudopneumoniae* Dawn 1.0×10^7 cfu mL^{-1}) con el volumen de incubación de la disolución del anticuerpo de detección manteniendo fijos los volúmenes de incubación del anticuerpo de captura en 100 μL y de la disolución bacteriana (Dawn 1.0×10^7 cfu mL^{-1}) en 200 μL y representación de las relaciones S/N. Condiciones experimentales: ProtA-MBs= 10 μL (30 mg mL^{-1}); [antiS37] y [antiS37-HRP] = 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [Strp-HRP] = 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$; t = 60 min; E_{app} = -0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

El efecto de la variación del volumen de incubación de la disolución bacteriana (Dawn 1.0×10^7 cfu mL^{-1}), estudiado en el intervalo comprendido entre 25 y 500 μL , trabajando con el volumen de incubación seleccionado para las disoluciones de ambos anticuerpos demostró que se obtenían los mejores resultados trabajando con 200 μL de la disolución de bacteria (resultados no mostrados).

Por lo que se refiere a las variables implicadas en el proceso de detección electroquímica (concentración de H_2O_2 , cantidad de TTF depositado y potencial aplicado), se utilizaron las seleccionadas previamente por el Grupo de Investigación para este sistema [Loaiza, 2008].

4.1.1.4. Curvas de calibrado y características analíticas

Los inmunosensores basados en el empleo de SPEs suelen ser desechables, lo que supone el uso de un electrodo nuevo para cada medida. Como consecuencia, la reproducibilidad de las señales analíticas obtenidas con diferentes magnetoinmunosensores fabricados de la misma manera es un aspecto esencial a considerar para asegurar la utilidad práctica real del diseño. Atendiendo a esto, en primer lugar se evaluó la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas con cinco magnetoinmunosensores diferentes fabricados de la misma manera y con la misma concentración de bacteria, realizando el estudio para dos tipos de cepas de *S. pneumoniae* (Dawn 1.0×10^6 cfu mL^{-1} y R6 1.0×10^7 cfu mL^{-1}). Los valores de las RSDs obtenidas (**Tabla 11**) reflejaron una buena precisión de las medidas y demostraron la fiabilidad del método de fabricación del magnetoinmunosensor.

Aplicando las condiciones experimentales optimizadas previamente, se construyeron las curvas de calibrado para ambos serotipos de *S. pneumoniae*, representando la intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en función del logaritmo de la concentración de bacteria (en cfu mL^{-1}) (**Figura 34**). Las características de los intervalos lineales, así como los LDs se recogen en la **Tabla 11**. Los LDs se obtuvieron de acuerdo con el criterio $3s_b/m$, donde m es la pendiente de la zona lineal del calibrado y s_b es la desviación estándar calculada con 10 valores de intensidad de corriente obtenidos con diferentes suspensiones bacterianas (a niveles de concentración de 1.0×10^5 cfu mL^{-1} o 1.0×10^6 cfu mL^{-1} para las cepas Dawn y R6, respectivamente).

Tabla 11. Características analíticas que resultan de las curvas de calibrado obtenidas para ambos serotipos de *S. pneumoniae*.

Serotipo	Intervalo lineal (cfu mL ⁻¹)	Pendiente (A)	r	RSD _{n=5} * (%)	LD (cfu mL ⁻¹)
Dawn	$4.3 \times 10^4 - 1.0 \times 10^7$	$(2.7 \pm 1.0) \times 10^{-7}$	0.996	11.5	1.5×10^4 (3.0×10^3 cfu)
R6	$7.5 \times 10^5 - 1.0 \times 10^8$	$(2.9 \pm 0.7) \times 10^{-7}$	0.998	6.4	6.3×10^5 (1.3×10^5 cfu)

*Nivel de concentración bacteriana: 1.0×10^6 y 1.0×10^7 cfu mL⁻¹ para la cepa Dawn y R6 respectivamente.

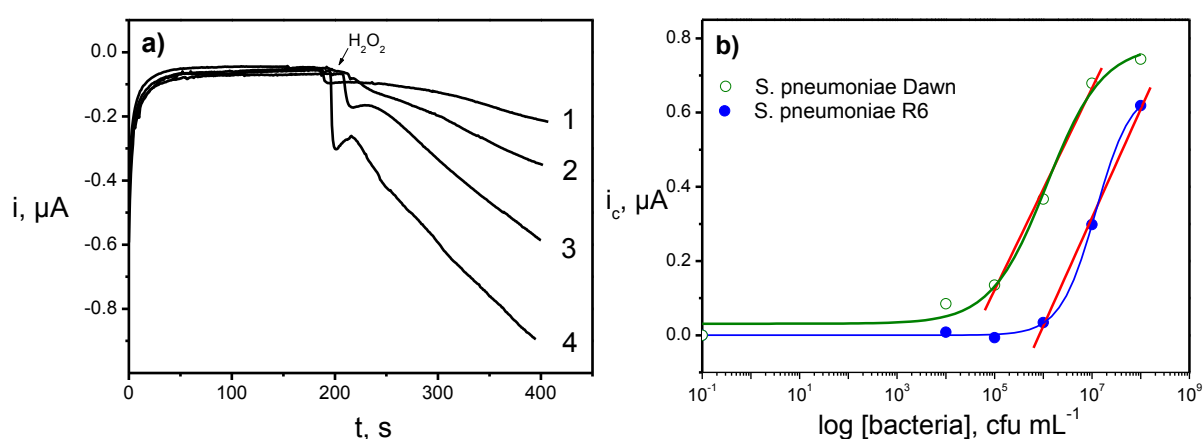


Figura 34. a) Señales amperométricas obtenidas para distintas concentraciones de la cepa Dawn: 0 (1), 1.0×10^5 (2), 1.0×10^6 (3) y 1.0×10^7 (4) cfu mL⁻¹ (la flecha indica el momento de adición del H₂O₂); b) Intervalo lineal de las curvas de calibrado obtenidas para las cepas Dawn y R6. Condiciones experimentales: ProtA-MBs= 10 μL (30 mg mL⁻¹); [antiS37] y [antiS37-HRP] = 20 μg mL⁻¹; [Strp-HRP] = 10 μg mL⁻¹; t = 60 min; V_{Abs} = 100 μL; V_{bacteria} = 200 μL; E_{app} = -0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag.

Aunque los valores de LD resultantes, de 1.5×10^4 cfu mL⁻¹ (3.0×10^3 cfu) y 6.3×10^5 cfu mL⁻¹ (1.3×10^5 cfu) para las cepas Dawn y R6, respectivamente, se pueden considerar bastante buenos teniendo en cuenta que no se llevó a cabo ningún proceso de preconcentración/enriquecimiento previo a la cuantificación, estos valores podrían mejorarse aumentando el tiempo de incubación o el volumen de muestra.

4.1.1.5. Estudio de interferencias

El *S. pneumoniae* se determina en una amplia variedad de muestras, tales como orina, muestras respiratorias y/o sanguíneas, matrices donde pueden existir otros componentes y bacterias que pueden interferir en la determinación de la bacteria con el magnetoinmunosensor desarrollado.

En este sentido, la selectividad del inmunosensor se investigó frente a otros estreptococos, normalmente presentes en las muestras clínicas, y otras bacterias filogenéticamente no relacionadas, tales como *E. coli*, registrando las respuestas amperométricas a dos concentraciones bacterianas distintas (1.0×10^7 y 5.0×10^5 cfu mL⁻¹), obteniéndose prácticamente la misma tendencia para ambas concentraciones. En todos los casos, se obtuvo la respuesta mayor con la cepa Dawn (**Figura 35**), por lo que las señales obtenidas para el resto de cepas bacterianas estudiadas se normalizaron con respecto a ella.

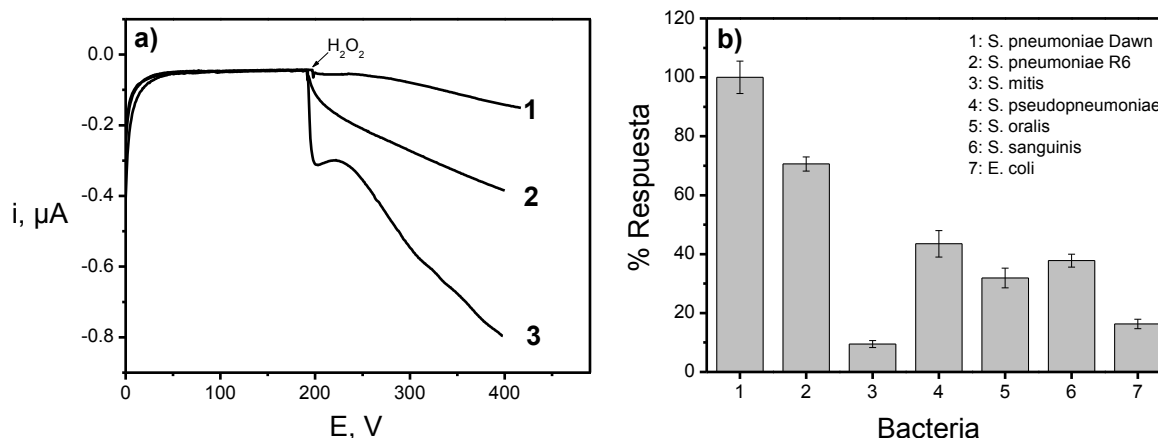


Figura 35. Especificidad del magnetoinmunosensor desarrollado frente a otras especies bacterianas. a) Señales amperométricas obtenidas tras la incubación en disoluciones 1.0×10^7 cfu mL⁻¹ de *S. mitis* (1), *S. pneumoniae* R6 (2) y *S. pneumoniae* Dawn (3); b) Comparación de la respuesta relativa obtenida para la cepa Dawn frente a otras cepas bacterianas (todas en concentración 1.0×10^7 cfu mL⁻¹). Condiciones experimentales: ProtA-MBs= 10 μL (30 mg mL⁻¹); [antiS37] y [antiS37-HRP] = 20 μg mL⁻¹; [Strp-HRP] = 10 μg mL⁻¹; t = 60 min; V_{Abs} = 100 μL; V_{bacteria} = 200 μL; E_{app} = -0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a 3×s (n = 3).

La señal amperométrica obtenida con la cepa R6 no encapsulada fue casi un 70 % de la obtenida con la cepa Dawn, mientras que *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis* y *S. sanguinis* proporcionaron respuestas inferiores al 40 %. Los resultados obtenidos se deben a la existencia de reacciones cruzadas entre neumococos y estreptococos relacionados filogenéticamente, dado que *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis* y *S. sanguinis* forman parte de un grupo muy parecido de especies denominadas estreptococos del grupo mitis [Kawamura, 1995]. Sin embargo, se desconoce el motivo por el que *S. mitis* no mostró reacciones cruzadas.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que el magnetoinmunosensor desarrollado posibilita la detección de neumococo con una elevada sensibilidad incluso en muestras en las que estén presentes otras bacterias.

4.1.1.6. Aplicación al análisis de muestras de orina

La utilidad del magnetoinmunosensor desarrollado se evaluó mediante su aplicación a la determinación de neumococo en muestras de orina humana inoculadas con la bacteria. Para ello se construyeron calibrados para ambas cepas de *S. pneumoniae* en muestras de orina inoculadas con concentraciones crecientes de bacteria comprendidas entre 1.0×10^5 y 5.0×10^7 cfu mL⁻¹, siguiendo la misma metodología descrita para las disoluciones patrón y se realizó una comparación estadística (aplicando el test t de Student a un nivel de significación de 0.05) de los valores de la pendiente obtenidos para las muestras inoculadas con las cepas R6 y Dawn ($(2.3 \pm 0.8) \times 10^{-7}$ y $(2.8 \pm 0.7) \times 10^{-7}$ A, respectivamente) con los valores de la pendiente obtenidos para las disoluciones estándar ($(2.9 \pm 0.7) \times 10^{-7}$ y $(2.7 \pm 1.0) \times 10^{-7}$ A, respectivamente), lo que permitió concluir que las muestras de orina no originaban efecto matriz.

En consecuencia, el análisis de cinco muestras de orina inoculadas a tres niveles de concentración se llevó a cabo mediante interpolación de las correspondientes señales amperométricas en las curvas de calibrado obtenidas con las disoluciones

estándar. Los contenidos medios de bacteria determinados en las muestras se recogen en la **Tabla 12**.

Tabla 12. Resultados obtenidos en el análisis de muestras de orina inoculadas.

Serotipo	Concentración de bacteria inoculada (cfu mL ⁻¹)	Valor medio encontrado (cfu mL ⁻¹)*
Dawn	5.0×10^4	$(6.3 \pm 0.2) \times 10^4$
	1.0×10^6	$(1.0 \pm 0.2) \times 10^6$
R6	1.0×10^7	$(1.3 \pm 0.3) \times 10^7$

*Intervalos de confianza calculados para $\alpha = 0.05$.

Por otro lado, aunque el tiempo total de ensayo fue de 3.5 h, se comprobó que era posible la determinación de *S. pneumoniae* (2×10^6 cfu) en tan sólo 1.5 h.

Teniendo en cuenta que el diagnóstico de infección en el tracto urinario (UTI) se considera positivo para concentraciones de una sola bacteria mayores que 10^3 cfu mL⁻¹ en cultivos urinarios [García-Suárez, 2009], los resultados obtenidos demuestran la utilidad del magnetoinmunosensor desarrollado para la detección de UTI sin necesidad de realizar pasos previos de preconcentración, enriquecimiento o pretratamiento de la muestra.

4.1.2. MAGNETOSENSORES BASADOS EN UNA ESTRATEGIA DE INMUNO-PCR

Considerando el trabajo anterior y otro realizado en paralelo en el Grupo de Investigación en el que se puso a punto un magnetogenosensor basado en la amplificación mediante PCR de un fragmento de un gen específico para la determinación de *S. pneumoniae* [Campuzano, 2011], y con el fin de mejorar la sensibilidad de la determinación del *S. pneumoniae*, se desarrolló un método basado en el empleo de daPCR para amplificar una región específica del gen *lytA* característico de la bacteria, cuyo procedimiento, también basado en el empleo de ProtA-MBs, Strp-MBs, anticuerpos y sondas de captura específicas se ha descrito en el Apdo. 3.3.2.2. (Parte Experimental).

Brevemente, el fundamento de esta estrategia inmuno-PCR consistía en capturar selectivamente las bacterias con las MBs modificadas con el anticuerpo de captura (antiS37-MBs), realizar una daPCR de las mismas y detectar el amplicón obtenido con un magnetogenosensor. Este último se basaba en la modificación de Strp-MBs con una sonda de captura biotinilada, la hibridación con el amplicón obtenido anteriormente y el marcaje enzimático del híbrido resultante con un polímero comercial de Strp-HRP. Los protocolos de captura magnética de las MBs modificadas sobre los SPEs y de detección amperométrica se realizaron siguiendo el procedimiento descrito en el capítulo anterior para el magnetoinmunosensor de *S. pneumoniae*.

Los estudios con esta nueva metodología se realizaron mediante la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas tras el proceso de hibridación en las MBs modificadas con la sonda de captura biotinilada en presencia y ausencia de la secuencia complementaria sintética.

4.1.2.1. Obtención de amplicones mediante amplificación daPCR

La daPCR de las bacterias unidas a las ProtA-MBs modificadas con el anticuerpo de captura se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.3.2.2 de esta Memoria. Así, se obtuvieron amplicones de ss-DNA biotinilado con 235-bp a partir de ProtA-MBs incubadas en cultivos de *S. pneumoniae*. Los amplicones obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5 %). En la **Figura 36a** se muestran los resultados de la electroforesis obtenidos al realizar daPCR trabajando con cultivos de *S. pneumoniae* de diferente concentración (de 10^2 a 10^7 cfu mL⁻¹, carriles 2 a 7), así como los resultados del control negativo (daPCR realizada sobre antiS37-MBs sin bacteria, carril 8). Los resultados de esta electroforesis confirmaron la amplificación de los productos con el tamaño esperado (235 bp) y que podía obtenerse amplicón daPCR a partir de tan sólo 20 cfu de *S. pneumoniae*.

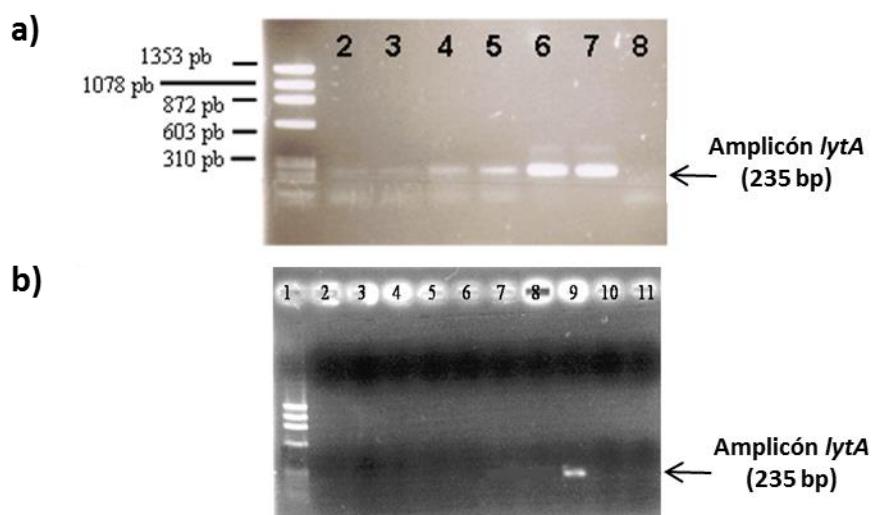


Figura 36. Resultados de electroforesis en gel de agarosa (1.5 %). Productos obtenidos por daPCR a partir de antiS37-MBs incubadas con: a) cultivos de neumococo de diferente concentración. Carril: 1) Marcadores (RF ADN de Φ X174 digerido con HaeIII); 2 - 7) daPCRs de cultivos de *S. pneumoniae* R6 de diferente concentración: 10^2 (2), 10^3 (3), 10^4 (4), 10^5 (5), 10^6 (6) y 10^7 (7) cfu mL⁻¹; 8) control negativo (antiS37-MBs incubadas en disolución reguladora PBS 0.01 M a pH 7.4); b) diferentes cultivos bacterianos. Carril: 1) Marcadores (RF ADN de Φ X174 digerido con HaeIII); 2 - 10) *S. oralis* (1.0×10^8), *S. sanguinis* (1.3×10^8), *S. pseudopneumoniae* (2.3×10^8), *S. mitis* (1.0×10^8), *S. constellatus* (1.4×10^8), *S. anginosus* (1.2×10^8), *S. mitis* SK137 (1.0×10^8), *S. pneumoniae* R6 (1.1×10^8), *E. coli* (7.5×10^7) cfu mL⁻¹; 11) control negativo (antiS37-MBs incubadas en disolución reguladora PBS 0.01 M de pH 7.4).

Cabe destacar, que a pesar de que el anticuerpo empleado presenta cierta afinidad por otros estreptococos que contienen el gen *lytA* (*S. mitis*, *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis* y *S. sanguinis*) [Campuzano, 2010], no se obtuvo amplicón en presencia de altas concentraciones de dichas bacterias (1.0×10^8 cfu mL⁻¹) (Figura 36b), demostrándose la elevada especificidad de la región a amplificar del gen seleccionado para la determinación selectiva de neumococo.

4.1.2.2. Detección amperométrica de los amplicones daPCR

Los amplicones obtenidos mediante daPCR sobre los conjugados de bacteria-antiS37-MBs (biotinilados y predominantemente de cadena sencilla) se diluyeron 100 veces con la disolución reguladora Tris-HCl a pH 7.2, tomándose posteriormente 100 μ L de dicha dilución para realizar el procedimiento de hibridación sobre las Strp-MBs modificadas con la sonda de captura específica biotinilada. Tras llevar a cabo el

marcaje enzimático del híbrido biotinilado resultante, con un polímero ultrasensible de Strp-HRP, las MBs se capturaban magnéticamente sobre un TTF-SPAUE y se llevaba a cabo la detección amperométrica del proceso de hibridación ($E_{app} = -0.15$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag).

En primer lugar, se comprobó la fiabilidad del ensayo propuesto comparando las señales amperométricas obtenidas tras realizar el proceso de hibridación de las MBs modificadas con la sonda de captura biotinilada, en presencia y en ausencia de la secuencia complementaria sintética marcada con biotina. Como puede observarse en la **Figura 37**, en ausencia de sonda sintética diana no se obtuvo respuesta amperométrica apreciable, lo que confirmaba la ausencia de adsorciones inespecíficas del polímero enzimático en ausencia de hibridación.

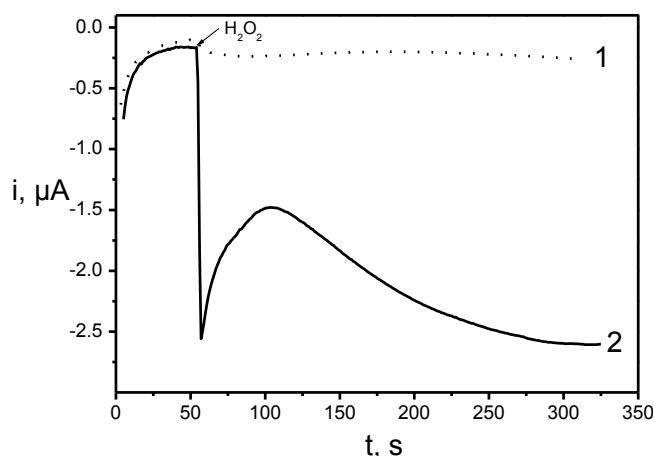


Figura 37. Señales amperométricas obtenidas tras llevar a cabo el proceso de hibridación en ausencia (1) y presencia (2) de la sonda diana biotinilada complementaria sintética. Condiciones experimentales: [sonda de captura] = 1 μ M; [oligonucleótido complementario] = 150 nM; [H_2O_2] = 0.35 mM; $E_{app} = -0.15$ V (vs electrodo pseudoreferencia de Ag).

Una vez comprobada la fiabilidad del método, se compararon las respuestas amperométricas observadas tras realizar el proceso de hibridación sobre los amplicones obtenidos a partir de antiS37-MBs incubadas en ausencia o en presencia de las cepas R6 y Dawn, a un nivel de concentración de 10^2 cfu mL⁻¹. Como queda reflejado en la **Figura 38**, la clara diferencia de intensidad de señal obtenida en

presencia y ausencia de bacteria demuestra la validez de la nueva estrategia inmuno-PCR propuesta para la detección de bajas concentraciones de neumococo.

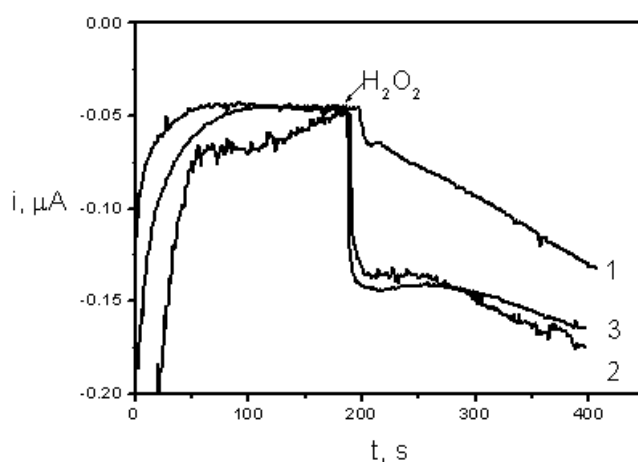


Figura 38. Señales amperométricas observadas para los productos de la daPCR obtenidos empleando como molde antiS37-MBs incubadas en ausencia de bacteria (1) y con cultivos bacterianos de *S. pneumoniae* R6 (2) y Dawn (3) 10^2 cfu mL⁻¹. Mismas condiciones experimentales que Figura 37.

4.1.2.3. Curvas de calibrado y características analíticas

Siguiendo la metodología de la estrategia desarrollada, se construyeron las curvas de calibrado para ambos serotipos de neumococo, representando la intensidad de corriente obtenida en función del logaritmo de la concentración del cultivo bacteriano (expresada en cfu mL⁻¹). En la **Tabla 13** se resumen las características analíticas obtenidas para la determinación de cada uno de los serotipos.

Tabla 13. Parámetros característicos de las curvas de calibrado y características analíticas obtenidas en la determinación de ambos serotipos de neumococo mediante la estrategia inmuno-daPCR con detección amperométrica.

Serotipo	Intervalo lineal (cfu mL ⁻¹)	Sensibilidad (A)	RSD _{n=5} * (%)	LD (cfu mL ⁻¹)
Dawn	$1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^4$ ($r = 0.994$)	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-8}$	6.2	130 (26 cfu)
R6	$1.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^4$ ($r = 0.994$)	$(1.4 \pm 0.2) \times 10^{-8}$	8.0	132 (26 cfu)

*Nivel de concentración bacteriana de 1.0×10^3 cfu mL⁻¹.

Los LDs (130 y 132 cfu mL⁻¹ para la cepas Dawn y R6 respectivamente), se calcularon de acuerdo con la expresión $3s_b/m$, donde m es la pendiente de la correspondiente curva de calibrado y s_b la desviación estándar ($n = 10$) de las señales amperométricas obtenidas para diferentes cultivos bacterianos, a un nivel de concentración de 1.0×10^3 cfu mL⁻¹. Los valores obtenidos fueron entre 100 y 1000 veces más bajos que los alcanzados mediante la metodología desarrollada previamente sin amplificación por daPCR. Además, los valores de RSD ($n = 5$) obtenidos, inferiores al 10% para ambos serotipos, demuestran la buena reproducibilidad de la estrategia desarrollada teniendo en cuenta que se trabajaba con una baja concentración bacteriana (200 cfu) y con sensores desechables. Asimismo, estos resultados demostraron la eficiencia de los procesos de reconocimiento e hibridación llevados a cabo en la superficie de las MBs modificadas, junto con la fiabilidad del método desarrollado, lo que adquiere una gran importancia al trabajar con SPEs desechables de un solo uso.

Como conclusión final, indicar que la metodología magneto-inmuno-daPCR implementada permite llevar a cabo la detección de *S. pneumoniae* no sólo con una elevada sensibilidad, sino también con una gran especificidad frente a otros estreptococos. Cabe destacar, asimismo, la buena reproducibilidad obtenida considerando también la naturaleza desechable de los sensores utilizados y la baja concentración bacteriana empleada. Como consecuencia, cabe la posibilidad de desarrollar metodologías similares para llevar a cabo la detección de otras bacterias patógenas.

4.2. DESARROLLO DE MAGNETOINMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE *Staphylococcus aureus*

Los organismos patógenos presentes en alimentos, entre los que se incluyen virus, bacterias, hongos y parásitos, producen enfermedades que suponen un serio problema de salud pública y seguridad alimentaria; entre todos ellos, las bacterias son las causantes del 91 % de dichas enfermedades, siendo el *S. aureus* una de las principales.

En la introducción de esta Memoria se ha comentado la patogenicidad del *S. aureus*, bacteria responsable de un gran número de infecciones, que pueden ir desde pequeñas afecciones de la piel a patologías más severas, tales como intoxicaciones alimentarias, neumonías o meningitis. El *S. aureus* presenta una patogénesis multifactorial, y además muchas de las cepas presentan resistencia a antibióticos, por lo que a veces se dificulta mucho el control de las infecciones. De ello deriva la importancia de su detección, tanto en muestras clínicas como alimentarias, como medida preventiva, por lo que resulta de gran interés el desarrollo de dispositivos que permitan una determinación rápida y fiable de este patógeno.

Con este objetivo se planteó el desarrollo de un magnetoinmunosensor para la determinación de *S. aureus* a través de la detección de la ProtA, proteína específica de esta bacteria presente en su pared bacteriana. Dicho magnetoinmunosensor está basado en el empleo de un anticuerpo de captura específico para la ProtA y en un formato competitivo directo entre la ProtA de la bacteria y ProtA marcada con HRP (ProtA-HRP). Puesto que el anticuerpo de captura empleado (antiProtA) es una inmunoglobulina, la proteína A, presente en disolución o en la pared de las células del *S. aureus*, presenta una elevada afinidad tanto por la región Fab como Fc del mismo. Por lo tanto, la interacción entre la ProtA presente en las partículas magnéticas y el antiProtA se puede dar de dos maneras distintas: el anticuerpo se puede inmovilizar de una forma inespecífica a través de la región Fc, dejando expuesta a la disolución la región de reconocimiento al antígeno (**Figura 39a**), o bien se puede inmovilizar sobre las ProtA-MBs de forma específica a través de su región Fab (**Figura 39b**)

[Makaraviciute, 2013]. En cualquiera de los dos casos, es posible llevar a cabo la determinación de la ProtA o el *S. aureus* mediante un formato de inmunoensayo competitivo empleando ProtA-HRP.

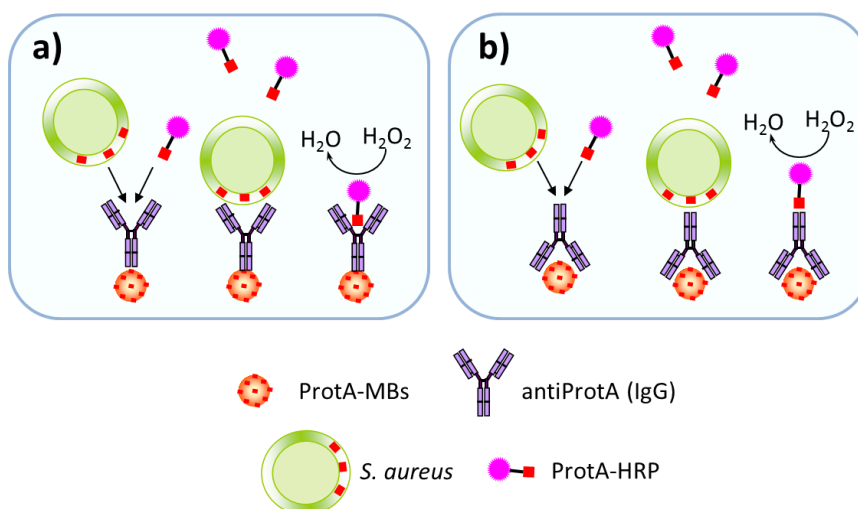


Figura 39. Procedimientos de inmunoensayo para la detección de la ProtA o del *S. aureus* mediante el empleo de ProtA-MBs (inmovilización del antiProtA a las ProtA-MBs mediante reacciones de afinidad por la región Fab y Fc, a) y b), respectivamente) y un formato de inmunoensayo competitivo empleando ProtA-HRP como marcador enzimático.

En el formato implementado, (descrito en el Apdo. 3.3.3. de la Parte Experimental), el antígeno (la ProtA o el *S. aureus*) y la ProtA-HRP compiten por los sitios de unión de un antiProtA inmovilizado sobre la superficie de ProtA-MBs (bien a través de la región Fc o Fab), detectándose posteriormente mediante amperometría (-0.15 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag) la reducción del H_2O_2 añadido mediada por TTF.

El funcionamiento de la metodología desarrollada se demostró mediante la comparación de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de bacteria, observándose que al realizar la incubación con *S. aureus* (10^5 cfu mL⁻¹) se obtenía una intensidad de corriente aproximadamente dos veces más baja que la obtenida en ausencia de bacteria (**Figura 40a**). Además, se evaluó la posible existencia de adsorciones inespecíficas mediante la incubación de las ProtA-MBs con una disolución de ProtA-HRP (0.1 µg mL⁻¹) en ausencia de anticuerpo de captura,

observándose intensidades de corriente muy bajas (barra 1 en **Figura 40b**). Sin embargo, al realizar una incubación previa con la disolución de antiProtA ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), las intensidades aumentaban diez veces (barra 3 en **Figura 40b**). Estos ensayos demostraron la inexistencia de adsorciones inespecíficas, evitando así tener que emplear etapas de bloqueo en la fabricación del inmunosensor.

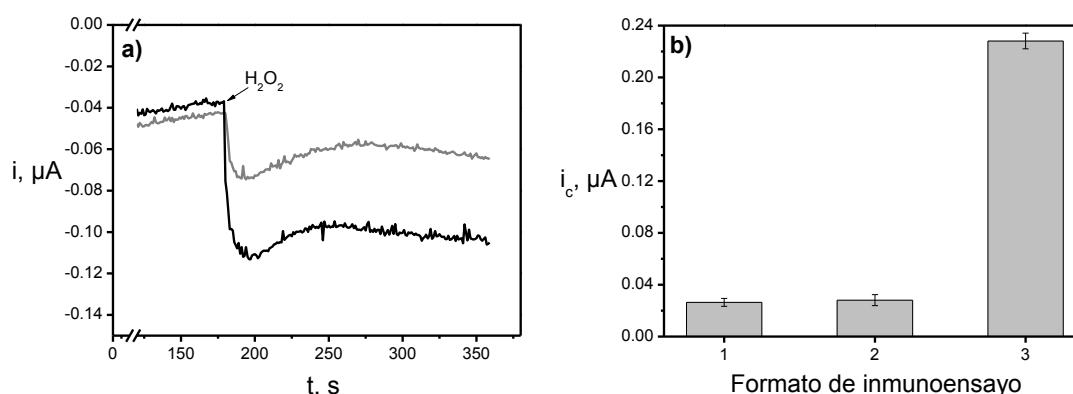


Figura 40. Respuestas amperométricas obtenidas con el magnetoinmunosensor de *S. aureus* tras la adición de H_2O_2 0.35 mM al realizar la incubación con una disolución salina ausente de bacteria (amperograma negro) y con una disolución salina que contiene 10^5 cfu mL^{-1} de *S. aureus* (amperograma gris) a). Valores de intensidad de corriente obtenidos en estado estacionario al realizar la incubación de las ProtA-MBs con ProtA-HRP $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (barra 1) con antiProtA $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ y ProtA $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (barra 2) y con antiProtA $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ y ProtA-HRP $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (barra 3). Barras de error correspondientes a $3 \times s$ (n = 3).

A continuación se describirán los resultados más relevantes obtenidos en el desarrollo del magnetoinmunosensor amperométrico de *S. aureus*, en relación a la optimización de las variables experimentales implicadas en su fabricación, sus características analíticas, y su aplicación al análisis de muestras de leche inoculadas.

4.2.1. OPTIMIZACIÓN DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Al igual que en los trabajos anteriores, se estudiaron las variables experimentales que afectaban a la construcción del inmunosensor, empleando en este caso como criterio de selección la magnitud de las señales amperométricas obtenidas para $10^{-5} \mu\text{g mL}^{-1}$ de ProtA a -0.15 V (vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag) tras depositar $5 \mu\text{L}$ de una disolución de H_2O_2 3.5 mM sobre los MBs-TTF-SPAuEs.

Las variables experimentales implicadas en la medida electroquímica (potencial aplicado, concentración de H_2O_2 y cantidad de TTF depositada) fueron las empleadas en el capítulo anterior.

En la **Tabla 14** se resumen las variables experimentales optimizadas, los intervalos estudiados y los valores seleccionados para cada una de ellas.

Tabla 14. Optimización de variables experimentales.

Variable experimental	Intervalo de estudio	Valor seleccionado
$V_{\text{ProtA-MBs}}, \mu\text{L}$	1–10	5
$[\text{antiProtA}], \mu\text{g mL}^{-1}$	10–40	20
$V_{\text{antiProtA}}, \mu\text{L}$	50–200	100
$t_{\text{antiProtA}}, \text{min}$	15–60	30
$V_{\text{ProtA/S. aureus}}, \mu\text{L}$	20–200	50
$t_{\text{ProtA/S. aureus}}, \text{min}$	15–60	30
$[\text{ProtA-HRP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	0.05–1	0.5
$V_{\text{ProtA-HRP}}, \mu\text{L}$	50–200	200
$t_{\text{ProtA-HRP}}, \text{min}$	15–60	30

Volumen de ProtA-MBs

En primer lugar se estudió la influencia del volumen de la suspensión comercial de ProtA-MBs necesario para la preparación del magentoinmunosensor sobre las señales obtenidas, para lo que se consideraron volúmenes comprendidos entre 1 y 10 μL . En la **Figura 41**, se muestra la dependencia encontrada para la señal amperométrica en función de esta variable. Como puede observarse, la intensidad de corriente aumenta hasta un volumen de 2.5 μL , debido al incremento en la cantidad de anticuerpo de captura inmovilizado sobre las ProtA-MBs, se estabiliza entre 2.5 y 5.0 μL y a partir de este valor disminuye gradualmente, debido posiblemente al aumento de la resistencia a la transferencia electrónica cuando se captura sobre el electrodo una gran cantidad de MBs.

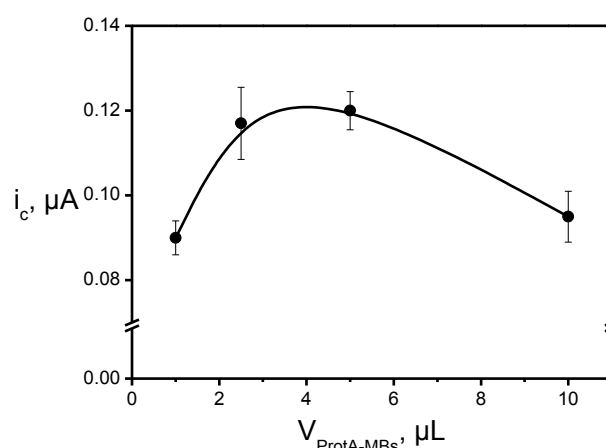


Figura 41. Dependencia de las intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en presencia de H_2O_2 0.35 mM en función del volumen empleado de la suspensión de ProtA-MBs para la fabricación del magnetoinmunosensor. Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M de pH 7.0; $[\text{TTF}] = 2.5 \mu\text{M}$; $[\text{antiProtA}] = 20 \mu\text{g mL}^{-1}$; $[\text{ProtA-HRP}] = 0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$; $[\text{ProtA}] = 10^{-5} \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$, $V_{\text{inc}} = 100 \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.15 \text{ V}$ vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó un volumen de 5 μL de suspensión de ProtA-MBs para continuar trabajando, valor con el que además resultó la menor variabilidad entre las medidas realizadas.

Concentración de antiProtA y ProtA-HRP

Como se ha comentado anteriormente, la optimización de la concentración del anticuerpo inmovilizado sobre las MBs desempeña un papel clave en la preparación del inmunosensor. Por ello, a continuación se estudió el efecto de la concentración de anticuerpo de captura (antiProtA) y la de antígeno marcado (ProtA-HRP) sobre las señales amperométricas obtenidas. La concentración de antiProtA se estudió en el intervalo de concentraciones comprendido entre 10 y 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observándose un incremento significativo del valor de intensidad de corriente con la concentración de anticuerpo hasta 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valor a partir del cual dicha intensidad disminuía significativamente (**Figura 42a**). Este efecto se puede atribuir a que al inmovilizar una cantidad de anticuerpo muy elevada sobre la superficie de las ProtA-MBs se dificultaba el acceso del antígeno a los sitios de unión del anticuerpo. Consecuentemente, se seleccionó el valor de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para estudios posteriores.

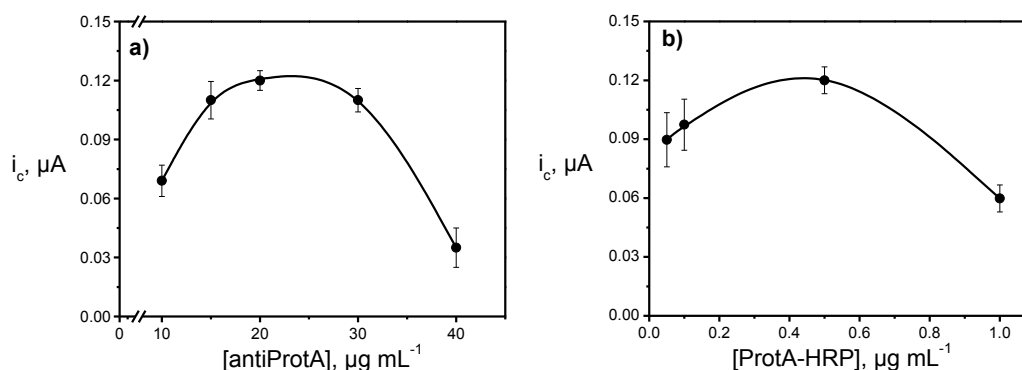


Figura 42. Dependencia de las intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en presencia de H_2O_2 0.35 mM en función de la concentración de antiProtA a) y ProtA-HRP b). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M de pH 7.0; $[TTF] = 2.5 \mu M$; $[ProtA-MBs] = 5 \mu L$; $[antiProtA] = 20 \mu g mL^{-1}$ (b); $[ProtA-HRP] = 0.5 \mu g mL^{-1}$ (a); $[ProtA] = 10^{-5} \mu g mL^{-1}$, $t_{inc} = 30$ min, $V_{inc} = 100 \mu L$; $E_{app} = -0.15$ V vs electrodo de pseudoreferencia Ag; $[ProtA-HRP] = 0.5 \mu g mL^{-1}$ (a) y $[antiProtA] = 20 \mu g mL^{-1}$ (b). Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Asimismo, se estudió el efecto de la concentración de antígeno marcado (ProtA-HRP), en un rango de concentración comprendido entre 0.05 y $1 \mu g mL^{-1}$, sobre la respuesta amperométrica del magnetoinmunosensor. Tal y como puede verse en la **Figura 42b**, la intensidad de corriente aumentaba con la concentración de ProtA-HRP hasta un valor de $0.5 \mu g mL^{-1}$ y disminuía para concentraciones superiores, por lo que se seleccionó esta concentración para llevar a cabo estudios posteriores.

Tiempos de incubación

La siguiente variable experimental que se consideró fue el tiempo de incubación con los distintos reactivos implicados en la fabricación del magnetoinmunosensor, variándolo de 15 a 60 min en todos los casos. En primer lugar se estudió el tiempo de incubación de la ProtA-HRP sobre las antiProtA-MBs, a continuación se estudió el tiempo de incubación del antiProtA sobre las ProtA-MBs, y finalmente el de la ProtA. En cada uno de estos estudios, se mantuvo un tiempo fijo de 30 min para el resto de disoluciones. Como puede observarse en la **Figura 43**, en todos los casos se obtuvieron las mayores respuestas amperométricas empleando tiempos de incubación de 30 min, por lo que con el fin de disminuir además en lo posible el tiempo de análisis, este valor fue seleccionado para continuar trabajando. El tiempo de

incubación de la ProtA debía ser lo suficientemente elevado como para asegurar que la mayor cantidad de antígeno se enlazaba al anticuerpo de captura inmovilizado sobre la superficie de las MBs. Estos resultados indican que, probablemente, en un tiempo de incubación de 30 min todos los parátomos del anticuerpo inmovilizado eran ocupados. Y, como era de esperar, un aumento de ProtA en la muestra se traduciría en una disminución de la cantidad de ProtA-HRP inmovilizada sobre las antiProtA-MBs, por lo que mayores tiempos de incubación en la disolución de analito daban lugar a menores señales amperométricas.

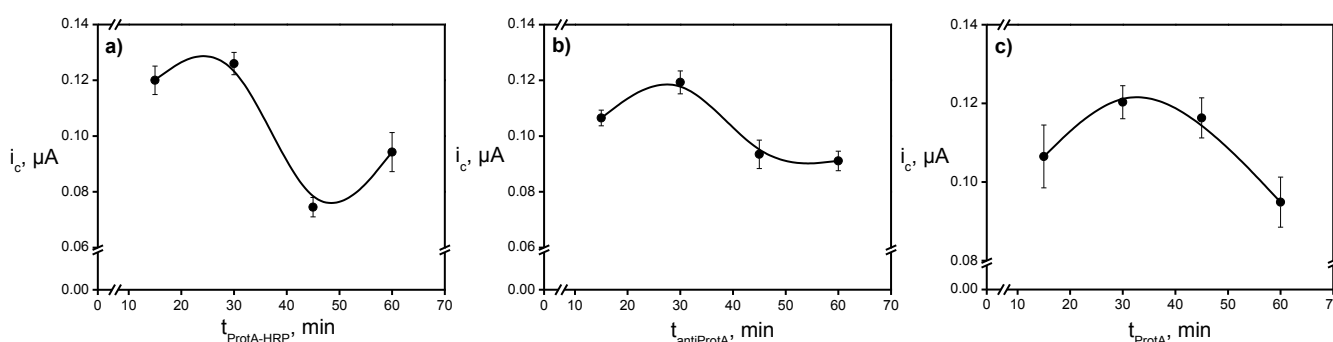


Figura 43. Dependencia de las intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en presencia de H_2O_2 0.35 mM en función del tiempo de incubación con la disolución de ProtA-HRP a), antiProtA b) y ProtA c). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M de pH 7.0; [TTF] = 2.5 μM ; [ProtA-MBs] = 5 μL ; [antiProtA] = 20 $\mu g mL^{-1}$; [ProtA-HRP] = 0.5 $\mu g mL^{-1}$; [ProtA] = 10^{-5} $\mu g mL^{-1}$, t_{inc} = 30 min; V_{inc} = 100 μL ; E_{app} = -0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Es de destacar que con los tiempos de incubación seleccionados, fue posible realizar la detección de la ProtA en un tiempo de análisis inferior a 2 h, representando una ventaja importante frente a otras metodologías desarrolladas para la determinación de esta bacteria.

Volúmenes de incubación

Por otro lado, se estudió el efecto que los volúmenes de incubación de las distintas disoluciones implicadas ejercían sobre las señales obtenidas. En estos estudios de optimización se trabajó con un volumen fijo de 100 μL en el resto de

disoluciones. El volumen de incubación de la disolución de antiProtA se varió en el intervalo comprendido entre 50 y 200 μL (**Figura 44a**) y, a pesar de que no se observó un gran cambio de intensidad de señal con la variación de este volumen, se obtuvo la mayor respuesta amperométrica trabajando con 100 μL , valor seleccionado como óptimo. Seguidamente, se varió el volumen de incubación de la disolución de ProtA-HRP (**Figura 44b**), en el mismo intervalo, y en este caso sí se observó un aumento de las señales amperométricas con el volumen de incubación, por lo que se continuó trabajando llevando a cabo esta incubación en un volumen de disolución de 200 μL .

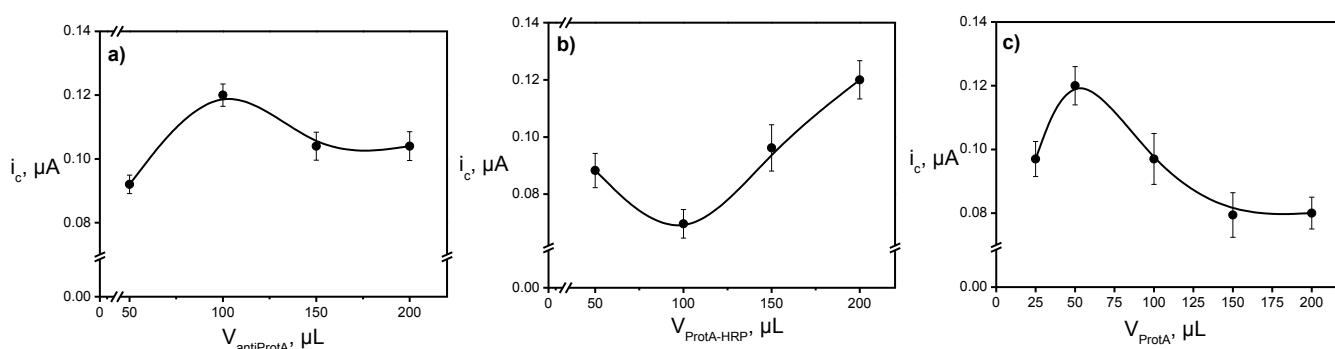


Figura 44. Dependencia de las intensidades de corriente obtenidas en estado estacionario en presencia de H_2O_2 0.35 mM en función del volumen de incubación con las disoluciones de: antiProtA a), ProtA-HRP b) y ProtA c). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M de pH 7.0; TTF = 2.5 μM ; [ProtA-MBs] = 5 μL ; [antiProtA] = 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [ProtA-HRP] = 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [ProtA] = 10^{-5} $\mu\text{g mL}^{-1}$; t_{inc} = 30 min; V_{inc} = 100 μL (a y b); $V_{\text{ProtA-HRP}}$ = 200 μL (c); E_{app} = -0.15 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Por último, y trabajando con los volúmenes de incubación optimizados anteriormente, se optimizó el volumen de incubación con la disolución de ProtA, variándolo de 25 a 200 μL (**Figura 44c**); en este caso, la intensidad de señal aumentaba hasta un volumen de 50 μL y disminuía para volúmenes superiores, por lo que se seleccionó este para la etapa de incubación con el antígeno.

4.2.2. CURVAS DE CALIBRADO Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS

Una vez seleccionadas las variables implicadas en el procedimiento de inmunoensayo y en la preparación del magnetoinmunosensor, se construyó un

calibrado para estándares de ProtA. Las respuestas obtenidas se normalizaron de acuerdo con la siguiente expresión:

$$S_n = \frac{i - i_\infty}{i_0 - i_\infty} \quad (1)$$

donde i es la señal amperométrica obtenida para una concentración dada de analito, i_∞ es la corriente medida en presencia de un exceso de analito e i_0 es la corriente en ausencia del mismo.

En este tipo de ensayo competitivo no existe una relación lineal entre la señal medida y la concentración de analito, sino que a mayor cantidad de antígeno en disolución, menor cantidad de antígeno marcado estará disponible para reaccionar con el anticuerpo inmovilizado, resultando así en un descenso de la señal amperométrica obtenida. Representando la intensidad de corriente obtenida frente al logaritmo de la concentración de analito, se obtuvo la curva de calibrado mostrada en la **Figura 45**, que presenta la forma sigmoidal característica de los formatos de inmunoensayo de tipo competitivo, y puede ajustarse a la siguiente ecuación paramétrica:

$$S_n = \frac{i_{\max} - i_{\min}}{1 + \left(\frac{x}{IC_{50}} \right)^h} + i_{\min} \quad (2)$$

donde x es la concentración de analito, i_{\max} es la asíntota máxima correspondiente a la señal en ausencia de analito, h es el valor de la pendiente de la curva en el punto de inflexión, IC_{50} es la concentración de analito en dicho punto (es decir, la concentración de analito que proporciona el 50 % de inhibición de la señal de i_{\max}) e i_{\min} es la asíntota mínima que corresponde a la señal en ausencia de analito [Escamilla-Gómez, 2007].

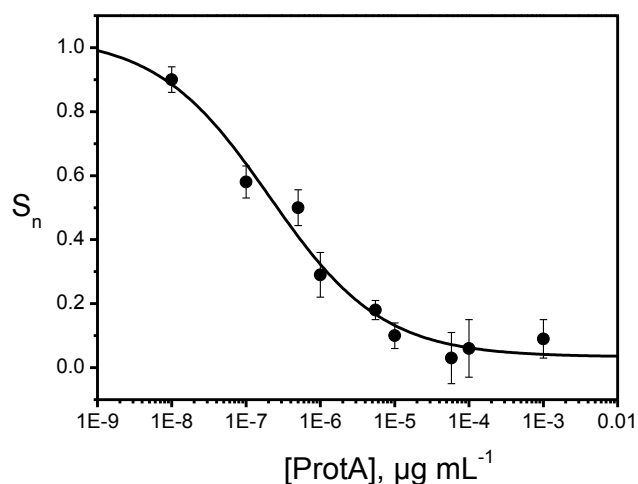


Figura 45. Curva de calibrado obtenida para la ProtA con el magnetoinmunosensor competitivo desarrollado, empleando las condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 14. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

El valor de IC_{50} , que corresponde a la concentración que produce un 50 % de inhibición de i_{max} , fue de $2.1 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1}$. En este tipo de curvas de calibrado, el intervalo dinámico (ID) se define como el intervalo de concentraciones de analito que produce una señal entre el 20 % y el 80 % del intervalo definido por las asíntotas máxima y mínima. El magnetoinmunosensor presentó un ID comprendido entre 1.7×10^{-8} y $2.6 \times 10^{-6} \mu\text{g mL}^{-1}$. Por otro lado, el LD de $3.9 \times 10^{-9} \mu\text{g mL}^{-1}$ se estimó como la concentración de antígeno que inhibía en un 10 % la unión del antígeno marcado al anticuerpo de captura. Dicho LD fue considerablemente inferior al que proporcionan otras metodologías de determinación de ProtA descritas [Rishpon, 1997], [Lin, 2008].

La ProtA es un antígeno específico del *S. aureus* presente en la pared celular del 99 % de las cepas bacterianas en una cantidad proporcional a la cantidad de células presentes en una muestra [Mirhabibollahi, 1990]. Además, en la bibliografía se ha descrito que el contenido de ProtA por célula de *S. aureus* es $\leq 0.16 \text{ ng}/10^6$ células para cepas con poco contenido de ProtA y $\geq 0.625 \text{ ng}/10^6$ células para cepas con elevados contenidos de dicha proteína [Spika, 1981]. El magnetoinmunosensor desarrollado se aplicó a la determinación de células comerciales no viables atenuadas por calor (Figura 46) y de células viables crecidas en el laboratorio, sin (Figura 47a) o con (Figura 47b) un tratamiento previo de lisis por ultrasonidos.

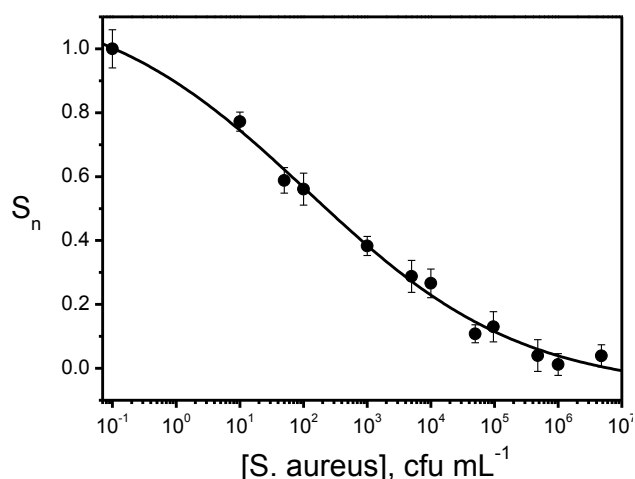


Figura 46. Curva de calibrado obtenida para células comerciales no viables de *S. aureus* atenuadas por calor, empleando las condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 14. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

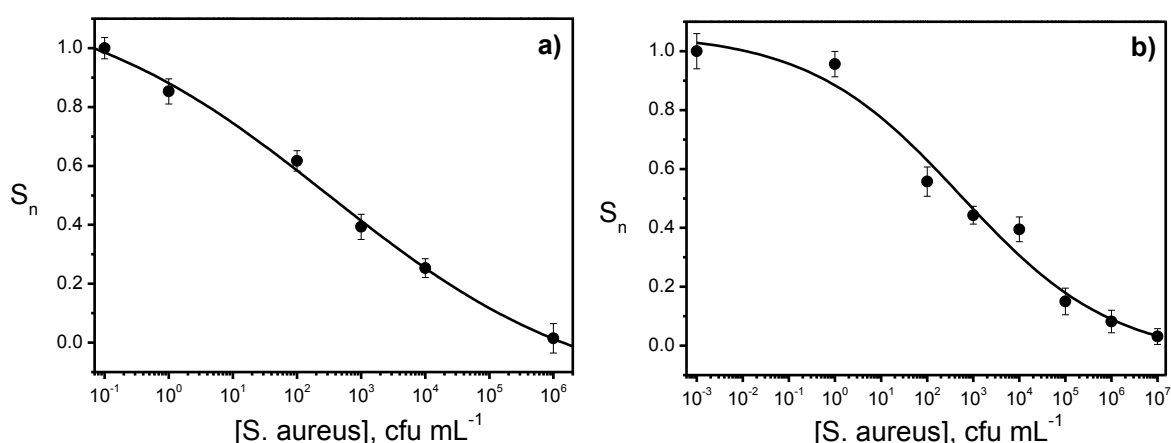


Figura 47. Curvas de calibrado obtenidas para células viables de *S. aureus* crecidas en el laboratorio: a) sin y b) con un tratamiento previo de lisis por ultrasonidos, empleando las condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 14. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Las características analíticas de las curvas de calibrado obtenidas se resumen en la **Tabla 15**. Aunque fueron similares para ambos tipos de células (atenuadas y sin atenuar), resultaron ligeramente mejores con las células atenuadas comerciales, lo que se atribuyó a que, además de que dichas células son del serotipo Cowan I, descrito como el que presenta mayor cantidad de ProtA en su pared celular, se obtenían por un tratamiento térmico que mejora la accesibilidad de la ProtA para su reconocimiento por parte del anticuerpo. Sin embargo y considerando que las muestras reales deben contener células sin atenuar se trabajó con ellas en estudios posteriores. Cabe

destacar, que el LD obtenido para las células viables sin atenuar (0.27 cfu mL^{-1}) fue tres órdenes de magnitud inferior al obtenido en trabajos previos con un inmunosensor basado en el empleo de ProtA-HRP y en la inmovilización covalente de RbIgGs sobre SPAuEs modificados con una monocapa de DTSP [Escamilla-Gómez, 2008^b].

Tabla 15. Características analíticas obtenidas para la determinación de células de *S. aureus*.

Parámetro	Células comerciales (atenuadas por calor)	Células crecidas en el laboratorio	
		Viables	Atenuadas (por ultrasonidos)
IC ₅₀ , cfu mL ⁻¹	2.5×10^2	3.6×10^2	4.1×10^2
LD, cfu mL ⁻¹	0.23	0.27	7.6×10^{-2}
ID, cfu mL ⁻¹	$3.1\text{--}1.6 \times 10^4$	$4.0\text{--}1.8 \times 10^4$	$1.0\text{--}1.0 \times 10^7$
Reproducibilidad, %	2.2 (n=8) (10 cfu mL^{-1})	4.7 (n=9) (10 cfu mL^{-1})	5.3 (n=6) ($1.0 \times 10^2 \text{ cfu mL}^{-1}$)

Puesto que se ha descrito que sometiendo a la bacteria a un tratamiento de lisis celular se pueden mejorar notablemente las características analíticas de su determinación, ya que de esta forma se libera la ProtA contenida en la pared celular quedando más accesible para la reacción de reconocimiento con el anticuerpo inmovilizado sobre las MBs [Mirhabibollahi, 1990], [Taylor, 2005], se llevó a cabo la lisis celular realizando un tratamiento previo de la suspensión bacteriana por ultrasonidos durante 30 min (procedimiento detallado en el Apdo. 3.2.3. de la Parte Experimental). Como era de esperar, el LD obtenido con las células lisadas fue un orden de magnitud inferior. Es de destacar que, en todos los casos, se obtuvo un LD inferior a 1 cfu mL^{-1} , lo que puede atribuirse al hecho de estar detectando ProtA que se libera de la pared celular aunque no se realice ningún pretratamiento de lisis.

Por otro lado, también se evaluó la reproducibilidad de las medidas obtenidas para los distintos tipos de células ensayadas, obteniéndose en todos los casos valores de $\text{RSD} \leq 5.3 \%$, demostrándose así que el procedimiento de fabricación del magnetoinmunosensor es fiable y que pueden obtenerse respuestas amperométricas reproducibles con diferentes inmunosensores preparados de la misma manera.

4.2.3. ESTUDIO DE INTERFERENCIAS

En muchos de los alimentos que suelen presentar contaminación por *S. aureus*, como es el caso de la leche, suelen aparecer otros microorganismos patógenos, tales como *Brucella* sp., *E. coli* y *Salmonella* [Brisabois, 1997], cuya presencia a veces puede interferir en la determinación de la bacteria de interés. Por esta razón, se evaluó la selectividad del magnetoinmunosensor desarrollado frente a *E. coli* y *S. choleraesuis*, comparando las respuestas amperométricas obtenidas en las condiciones experimentales optimizadas a los mismos niveles de concentración del *S. aureus* ($1.0\text{--}1.0 \times 10^7$ cfu mL⁻¹). En vista de los resultados obtenidos, mostrados en la **Figura 48**, se concluyó que ninguna de las bacterias ensayadas representaba una interferencia significativa en la determinación del *S. aureus*, ya que un aumento de la concentración de las mismas no se traducían en una disminución significativa de la respuesta amperométrica.

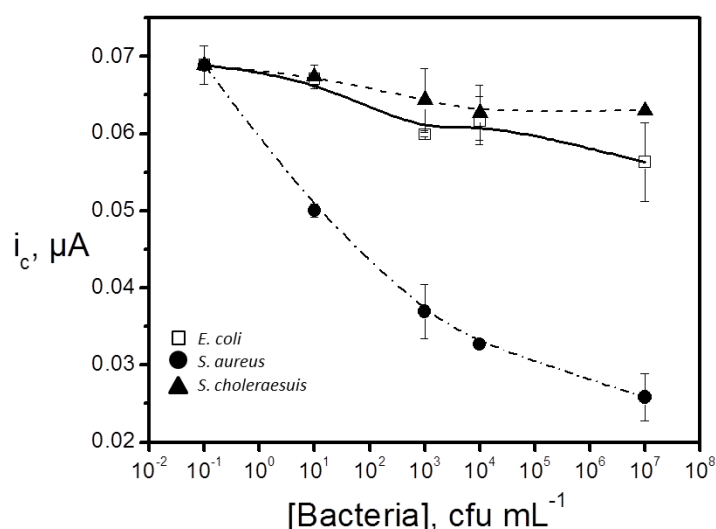


Figura 48. Especificidad del inmunosensor frente a *S. aureus*. Condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 14. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Estos resultados confirmaron que la disminución de las respuestas amperométricas obtenida al aumentar la concentración de bacteria, debida a la competición entre la ProtA-HRP y la ProtA en disolución, se debía únicamente a la interacción específica entre la ProtA constituyente de la pared celular del *S. aureus* y el antiProtA.

4.2.4. APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE MUESTRAS DE LECHE

El *S. aureus* es un microorganismo frecuentemente aislado de las glándulas mamarias de los animales productores de leche, así como de las instalaciones de las centrales lecheras. La leche, junto con el resto de derivados lácteos, son alimentos que suponen un excelente medio de cultivo para el crecimiento de esta bacteria, por lo que suponen una frecuente vía de transmisión de enfermedades alimentarias [Fotou, 2011].

Con el fin de evaluar la aplicabilidad de la metodología desarrollada a la determinación de esta bacteria en muestras de leche se realizó un calibrado de *S. aureus* en la muestra de leche descrita, en un intervalo de concentraciones comprendido entre 1.0 y 1.0×10^7 cfu mL⁻¹ (Figura 49) y aplicando la metodología descrita para las disoluciones estándar. El LD obtenido fue de 1 cfu mL⁻¹, valor muy inferior al contenido de *S. aureus* máximo permitido por la legislación alimentaria de 10^3 cfu mL⁻¹ de leche [Le Loir, 2003], demostrando la aplicabilidad del magnetoinmunosensor desarrollado a la determinación directa de la bacteria en muestras de leche, sin necesidad de dilución o tratamientos previos.

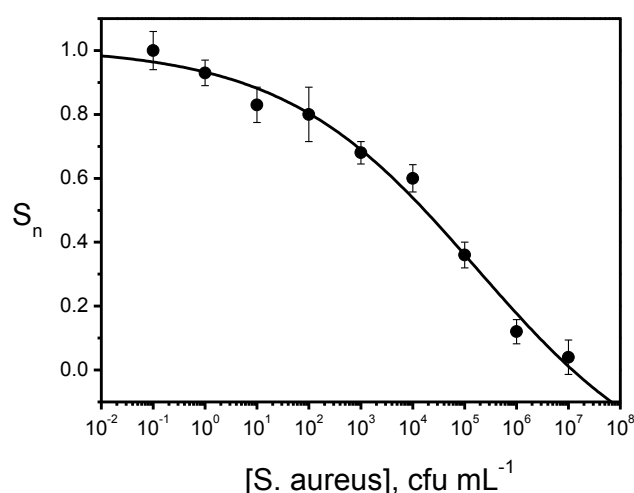


Figura 49. Curva de calibrado obtenida en muestras de leche semidesnatada inoculadas con *S. aureus* sometido posteriormente a lisis celular por ultrasonidos. Condiciones experimentales que se muestran en la Tabla 14. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

La utilidad del magnetoinmunosensor para el análisis de muestras reales, se demostró mediante su aplicación a muestras de leche semidesnatada inoculadas con la bacteria a dos niveles de concentración (10 y 100 cfu mL^{-1}) y sometidas al tratamiento de lisis celular descrito anteriormente (Apdo. 3.2.3.). Este tratamiento previo, además de facilitar la liberación parcial de la ProtA contenida en la pared celular de la bacteria, permitía la inactivación de la enzima lactoperoxidasa, presente en la leche de vaca [Gebicka, 1997]. A continuación, se realizó la determinación de la concentración de bacterias mediante interpolación de las señales amperométricas obtenidas, en el calibrado realizado en leche (**Figura 49**). En el análisis de seis muestras inoculadas a cada nivel de concentración se obtuvieron contenidos medios de (11.2 ± 0.9) y (106 ± 8) cfu mL^{-1} , respectivamente, con unos porcentajes de recuperación de (112 ± 10) y $(106 \pm 8) \%$, resultados que pueden considerarse bastante buenos teniendo en cuenta la sencillez y rapidez del tipo de análisis llevado a cabo y que ponen de manifiesto la aplicabilidad del magnetoinmunosensor para la determinación de bajos niveles de bacteria en este tipo de muestras.

Es importante resaltar que, a pesar de que el sistema de detección de *S. aureus* basado en el magnetoinmunosensor desarrollado no puede detectar células de cepas carentes de ProtA, el empleo de esta proteína como antígeno permitiría la detección de la bacteria independientemente de su viabilidad. Y aunque el *S. aureus* resultase lisado durante el proceso de pasteurización de la leche, sería posible la determinación del contenido de ProtA liberada de la pared celular de la bacteria, ya que es una proteína resistente al tratamiento térmico. De esta forma, la metodología desarrollada permitiría la identificación de intoxicaciones alimentarias producidas por *S. aureus* incluso en productos tratados a elevadas temperaturas.

Las buenas características analíticas obtenidas, junto con el reducido tiempo de análisis (2 h), la sencillez y fácil automatización y miniaturización de la instrumentación requerida hacen de la metodología desarrollada una prometedora alternativa en el desarrollo de dispositivos para el análisis in situ de este importante patógeno alimentario.

4.3. DESARROLLO DE INMUNOSENSORES AMPEROMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE MARCADORES CARDIACOS

En capítulos anteriores se ha comentado la implicación que tienen los marcadores cardiacos en el diagnóstico clínico de las diferentes enfermedades cardiovasculares, ya que, detectando que los niveles de estas proteínas en sangre se encuentran por encima de los establecidos como valores de corte se puede averiguar el tipo o riesgo de patología, el tiempo de iniciación del proceso o la ubicación de las células dañadas. La determinación de estas proteínas en sangre es, por tanto, de suma importancia para el diagnóstico precoz y como medida preventiva de la enfermedad, por lo que resulta de gran interés el desarrollo de nuevas plataformas de determinación más sensibles y rápidas que las utilizadas actualmente con este fin [Hasanzadeh, 2013].

En este sentido, se han desarrollado varios inmunosensores para la determinación de diferentes marcadores cardiacos. La metodología de trabajo seguida ha consistido en la optimización de cada una de las variables experimentales implicadas en su fabricación, el estudio de sus características analíticas, incluyendo la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas con distintos inmunosensores preparados de la misma manera, la posible existencia de interferencias y la estabilidad; en último lugar, se ha demostrado la validez de los inmunosensores implementados para el análisis clínico mediante el análisis de distintas muestras.

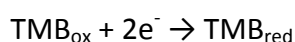
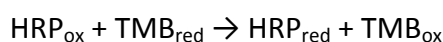
A continuación, se desarrollarán estos apartados para cada uno de los inmunosensores puestos a punto, describiendo los resultados más relevantes.

4.3.1. MAGNETOINMUNOSENSORES PARA LA DETERMINACIÓN DE TROPONINA T CARDIACA

El magnetoinmunosensor desarrollado para la determinación de cTnT, como se ha explicado anteriormente, está basado en un formato de inmunoensayo tipo

sándwich (representado en la **Figura 21** de la Parte Experimental), basado en el empleo de Strp-MBs y de una pareja de anticuerpos específicos, uno de ellos biotinilado y otro marcado con HRP, que reconocen regiones diferentes del antígeno.

Las Strp-MBs se incubaban en primer lugar con el anticuerpo de captura (biotin-anticTnT), permitiendo su inmovilización de forma muy estable gracias a la elevada afinidad del enlace biotina-estreptavidina. Posteriormente, las biotin-anticTnT-MBs se incubaban con una disolución de biotina para bloquear los grupos de Strp que hubiesen quedado sin reaccionar y, seguidamente, se realizaba la etapa de incubación con el antígeno (cTnT). Por último, se procedía a la incubación del anticuerpo de detección (anticTnT-HRP) y, tras los lavados correspondientes, las partículas modificadas se resuspendían en la disolución reguladora de medida y se inmovilizaban sobre la superficie de los SPAuEs con la ayuda de un imán de neodimio. Las señales amperométricas obtenidas (-0.10 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag) se registraban tras 200 s de la adición de 5 μ L de la disolución comercial de TMB- H_2O_2 . Las reacciones implicadas en la detección amperométrica de la reducción enzimática del peróxido de hidrógeno mediada por el TMB, se resumen a continuación:



El TMB es un sustrato cromogénico que adquiere una coloración azulada al reaccionar con la HRP. Además de haber sido empleado como agente de revelado en técnicas ELISA, es un buen mediador redox que ha sido ampliamente utilizado para el desarrollo de biosensores, ya que se ha demostrado que puede proporcionar una respuesta más rápida y mejorar la sensibilidad analítica [Wu, 2009].

El funcionamiento del inmunoensayo se comprobó comparando las señales amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de 0.6 ng mL^{-1} de cTnT, obteniéndose en este último caso intensidades de corriente, aproximadamente, ocho veces superiores a las obtenidas en ausencia de analito (**Figura 50**). Estos resultados

demostraron que el anticTnT-HRP se unía a la cTnT capturada por las biotin-anticTnT-MBs y que el inmunoensayo tipo sándwich propuesto era adecuado para la detección electroquímica del proceso de reconocimiento entre la proteína cardiaca y los anticuerpos de captura y detección.

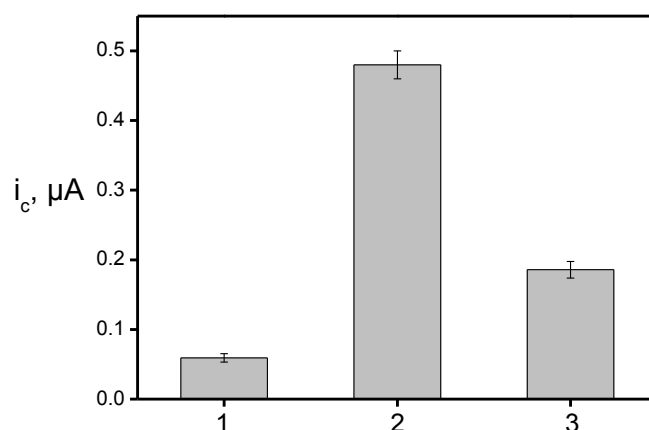


Figura 50. Evaluación de las adsorciones inespecíficas del analito y/o del anticuerpo marcado con la enzima: intensidad de corriente obtenida en ausencia de cTnT (1), en presencia de 0.6 ng mL⁻¹ de cTnT (2) y en presencia de 0.6 ng mL⁻¹ de cTnT sin haber inmovilizado anticTnT sobre las MBs (3). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $V_{\text{Strp-MBs}} = 5 \mu\text{L}$; [biotin-anticTnT] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [anticTnT-HRP] = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$, $V_{\text{inc}} = 100 \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs electrodo de pseudoreferencia de Ag; sustrato enzimático: TMB-H₂O₂ diluido 10 veces. Barras de error correspondientes a 3 \times s (n = 3).

4.3.1.1. Optimización de variables experimentales

Una vez comprobado que el diseño de inmunoensayo era adecuado para el desarrollo del magnetoinmunosensor, se estudiaron las variables experimentales involucradas en su fabricación y funcionamiento. Para ello se tomó como criterio de selección o bien la magnitud de la señal amperométrica obtenida en presencia de 0.6 ng mL⁻¹ de cTnT o, en algunos casos, la relación entre los valores de las señales amperométricas obtenidas en ausencia y en presencia de 0.6 ng mL⁻¹ de cTnT.

En la **Tabla 16** quedan reflejadas las variables experimentales estudiadas, los intervalos ensayados y los valores seleccionados para trabajar en condiciones óptimas.

Tabla 16. Optimización de variables experimentales.

Variable experimental	Intervalo de estudio	Valor seleccionado
$V_{\text{Strp-MBs}}$, μL	1–15	5
[biotin-anticTnT], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.5–20	2
$t_{\text{biotin-anticTnT}}$, min	10–60	30
Biotina, % (w/v)	0.005–10	0.005
t_{biotina} , min	15–30	15
t_{cTnT} , min	10–60	30
[anticTnT-HRP], $\mu\text{g mL}^{-1}$	1–20	1
$t_{\text{anticTnT-HRP}}$, min	10–60	45
t_{lavados} , min	0–10	2
$V_{\text{TMB-H}_2\text{O}_2}$, μL	1–10	5
E, V [a]	–0.20–+0.20	–0.10

[a] vs electrodo de pseudoreferencia de Ag.

En primer lugar, se estudió la posible existencia de adsorciones inespecíficas del antígeno y/o del anticuerpo de detección, mediante incubación de las Strp-MBs en ausencia de biotin-anticTnT con dichos reactivos. Como puede observarse en la **Figura 50**, las señales obtenidas cuando se incubó el anticuerpo marcado en una disolución de biotin-anticTnT-MBs en ausencia de cTnT fueron muy bajas (barra 1), pero aumentaron en presencia de cTnT sin inmovilizar biotin-anticTnT (barra 3). Estos resultados indicaron la necesidad de utilizar un agente de bloqueo de los grupos de Strp no ocupados de las MBs.

Con el fin de minimizar las adsorciones inespecíficas observadas se evaluó el comportamiento de diferentes agentes bloqueantes (BSA, caseína y biotina). Los mejores resultados, en términos de S/N, se obtuvieron empleando biotina, por lo que se realizaron estudios con el fin de seleccionar la concentración y el tiempo óptimo de incubación con una disolución de esta proteína. La concentración de la disolución del bloqueante se varió en el intervalo comprendido entre 0.005 y 10 % (w/v) y el tiempo de incubación entre 15 y 30 min, seleccionándose finalmente como condiciones óptimas de trabajo una concentración de 0.005 % y un tiempo de incubación de 15 min. En estas condiciones, la señal no-específica medida con las Strp-MBs sin

anticuerpo de captura era alrededor de un 39 % de la señal máxima medida con biotin-anticTnT-MBs. Estos resultados se consideraron aceptables y confirmaron que la estrategia propuesta para la detección electroquímica de cTnT utilizando el magnetoinmunosensor desarrollado era adecuada.

Volumen de Strp-MBs

A continuación se realizó el estudio de optimización del volumen de partículas necesario para la fabricación del inmunosensor. Para ello, se varió el volumen de Strp-MBs entre 1 y 15 μL , observándose las máximas señales amperométricas trabajando con volúmenes comprendidos entre 5 y 10 μL (0.05–0.1 mg de Strp-MBs), y una acusada disminución de la señal para volúmenes superiores, lo que puede atribuirse al aumento de la resistencia a la transferencia electrónica en presencia de cantidades elevadas de Strp-MBs (**Figura 51**). A la vista de estos resultados se seleccionó un volumen de 5 μL de la suspensión de Strp-MBs, cantidad de partículas que proporcionaba los resultados más reproducibles.

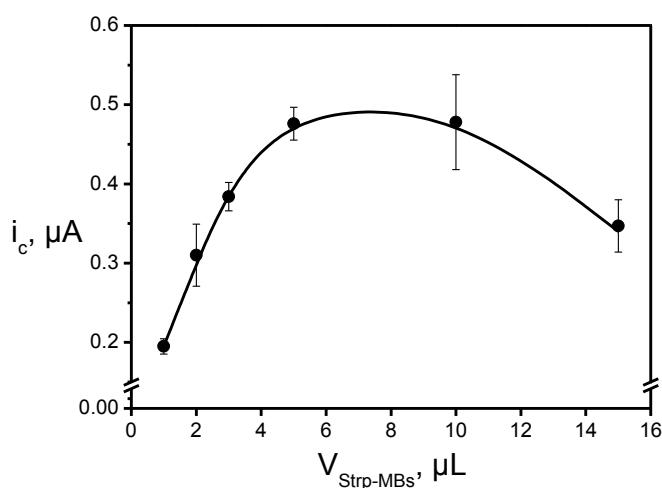


Figura 51. Dependencia de los valores de intensidad de corriente obtenidos en estado estacionario con el volumen de Strp-MBs. Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; [biotin-anticTnT] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [biotina] = 0.005 %; [anticTnT-HRP] = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [cTnT] = 0.6 ng mL^{-1} , $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$, $V_{\text{inc}} = 100 \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs electrodo de pseudoreferencia de Ag; sustrato enzimático: TMB- H_2O_2 diluido 10 veces. Barras de error correspondientes a 3 \times s ($n = 3$).

Concentración de biotin-anticTnT y anticTnT-HRP

Una vez seleccionado el volumen de Strp-MBs, se optimizó la concentración de ambos anticuerpos en el intervalo comprendido entre 0 y 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ comparando la relación S/N obtenida en ausencia y presencia de 0.6 ng mL^{-1} de cTnT. Se comenzó optimizando la concentración del biotin-anticTnT, con el fin de conseguir la máxima inmovilización de anticuerpo de captura sobre las Strp-MBs y evitar posibles adsorciones inespecíficas. Aunque las señales amperométricas obtenidas en presencia de antígeno aumentaban con la concentración de anticuerpo de captura hasta un valor de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, como se muestra en la **Figura 52a**, la mayor relación S/N se obtuvo trabajando con una concentración de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por lo que este valor se seleccionó para estudios posteriores. Por otro lado, aunque las señales específicas aumentaron con la concentración de anticTnT-HRP hasta un valor de ésta de 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, la mejor relación S/N se obtuvo para una concentración de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (**Figura 52b**), por lo que se seleccionó este valor para estudios posteriores.

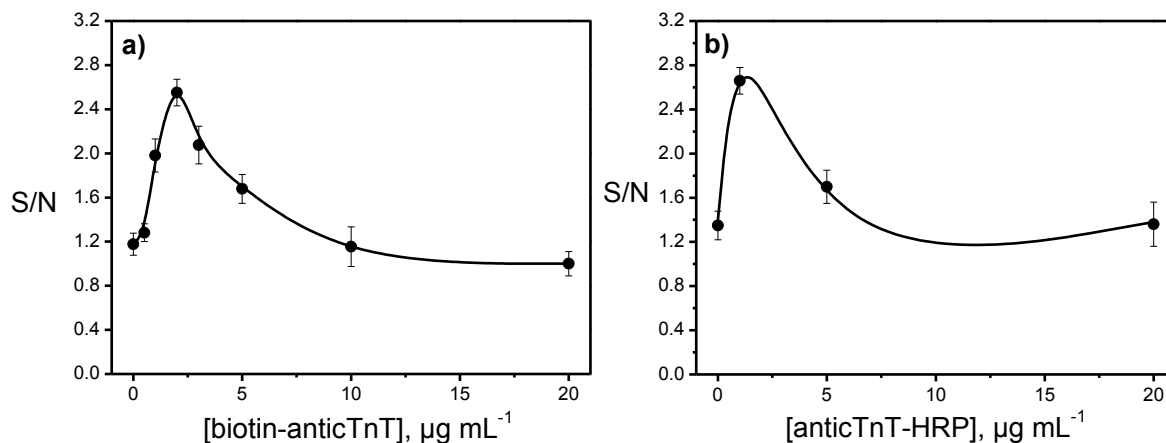


Figura 52. Dependencia de la relación S/N obtenida en ausencia y presencia de 0.6 ng mL^{-1} de cTnT con la concentración de biotin-anticTnT a) y anticTnT-HRP b). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $V_{\text{Strp-MBs}} = 5 \mu\text{L}$; [biotin-anticTnT] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b); biotina = 0.005 %; anticTnT-HRP = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (a); cTnT = 0.6 ng mL^{-1} , $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$, $V_{\text{inc}} = 100 \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs electrodo de pseudoreferencia de Ag; sustrato enzimático: TMB- H_2O_2 diluido 10 veces. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Tiempos de incubación

Una de las mayores limitaciones de las metodologías descritas hasta el momento para la determinación de cTnT basadas en estrategias de inmunoensayos son los largos tiempos requeridos para llevar a cabo la inmovilización de los anticuerpos y antígenos (normalmente superiores a 12 h) y para que se produzcan la reacciones inmunológicas (30 min–12 h).

Con el fin de solventar estas limitaciones y desarrollar estrategias rápidas, los siguientes estudios se centraron en la optimización de los tiempos de incubación con las diferentes disoluciones empleadas, así como de las etapas de lavado realizadas tras la etapa de incubación con el anticuerpo de detección. Como se puede observar en la **Figura 53**, las mayores respuestas amperométricas se obtuvieron trabajando con tiempos de incubación de 30 min con el biotin-anticTnT (**Figura 53a**) y la cTnT (**Figuras 53b**), y de 45 min con el anticTnT-HRP (**Figura 53c**), valores seleccionados para estudios posteriores.

Asimismo, se optimizó el tiempo de los últimos cinco lavados previos a la medida amperométrica. Se estudió el intervalo de tiempo comprendido entre 0 y 10 min (**Figura 53d**), obteniéndose los mejores resultados para 2 min, tiempo durante el cual las MBs modificadas se agitaban en el incubador (600 rpm, 37 °C) resuspendidas en la disolución reguladora de medida (TP 0.1 M de pH 7.0).

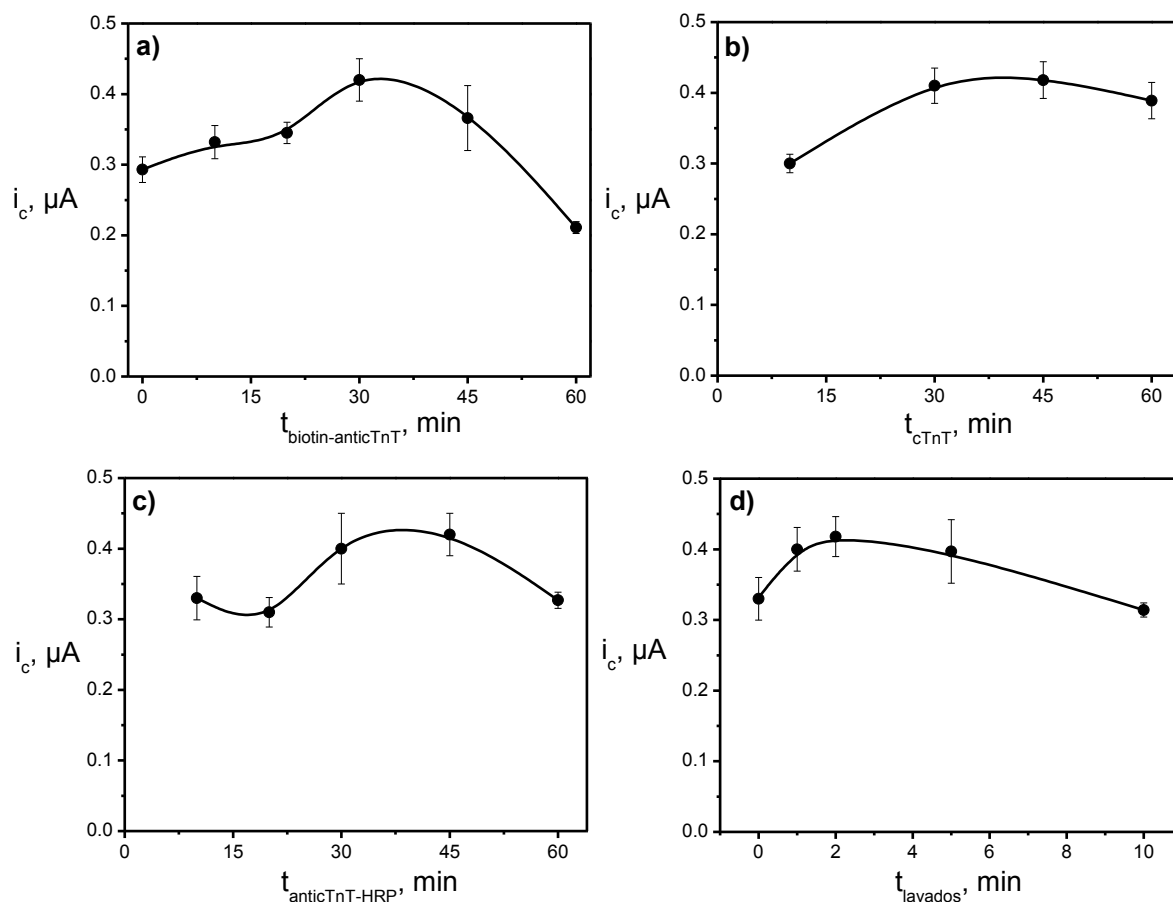


Figura 53. Dependencia de los valores de intensidad de corriente obtenidos en estado estacionario con el tiempo de incubación de biotin-anticTnT a), cTnT b), anticTnT-HRP c) y lavados d). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $V_{\text{Strp-MBs}} = 5 \mu\text{L}$; [biotin-anticTnT] = $2 \mu\text{g mL}^{-1}$; [biotina] = 0.005 %; [anticTnT-HRP] = $1 \mu\text{g mL}^{-1}$; [cTnT] = 0.6 ng mL^{-1} , $V_{\text{inc}} = 100 \mu\text{L}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$ (en todas las etapas restantes a la que se optimiza); $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs electrodo de pseudoreferencia de Ag; sustrato enzimático: TMB- H_2O_2 diluido 10 veces. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Aunque, como se verá más adelante, algunos trabajos de inmunosensores descritos en la bibliografía para la determinación de cTnT ofrecen mejores límites de detección ([Fonseca, 2011], [Zhang, 2011]), también requieren tiempos de análisis mucho más largos que el magnetoinmunosensor desarrollado, lo que resulta un inconveniente con vistas a su implementación para análisis *in situ*.

Variables de la medida electroquímica: volumen de TMB-H₂O₂ y potencial

Por último, se optimizaron las variables experimentales implicadas en la medida amperométrica, como son el volumen de TMB-H₂O₂ adicionado una vez estabilizada la corriente y el potencial aplicado. En primer lugar se estudió la influencia del volumen de disolución de sustrato enzimático añadido, registrándose las medidas electroquímicas obtenidas para volúmenes de TMB-H₂O₂ comprendidos entre 1 y 10 μL . Como se muestra en la **Figura 54a**, no se observó una mejora significativa al aumentar el volumen de esta disolución por encima de 5 μL , por lo que se seleccionó este valor para estudios posteriores.

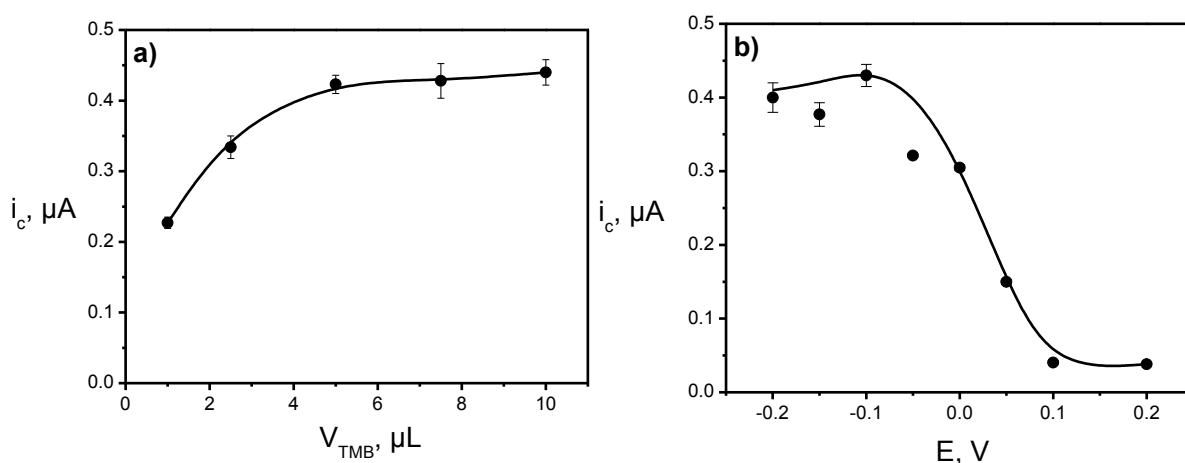


Figura 54. Dependencia de los valores de intensidad de corriente obtenidos en estado estacionario con el volumen de TMB-H₂O₂ añadido a) y el potencial aplicado b). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; [biotin-anticTnT] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [biotina] = 0.005 %; [anticTnT-HRP] = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [cTnT] = 0.6 ng mL^{-1} , t_{inc} = 30 min (biotin-anticTnT y cTnT) y 45 min (anticTnT-HRP), V_{inc} = 100 μL ; E_{app} = -0.10 V vs electrodo de pseudoreferencia de Ag (a); sustrato enzimático: TMB-H₂O₂ diluido 10 veces. Barras de error correspondientes a 3 \times s (n = 3).

La influencia del potencial aplicado sobre la respuesta amperométrica se estudió en el rango comprendido entre -0.20 y +0.10 V, observándose un estado estacionario de la señal entre -0.20 y -0.10 (**Figura 54b**), e intensidades de corriente inferiores para potenciales más positivos. En vista de estos resultados se seleccionó un potencial de trabajo de -0.10 V para monitorizar la reacción de afinidad, con el fin de lograr una detección sensible y minimizar el número de interferentes potenciales capaces de reducirse en la superficie de los SPAuEs.

4.3.1.2. Características analíticas y estabilidad

Una vez optimizadas las condiciones experimentales involucradas en la fabricación del magnetoinmunsensor, se construyó un calibrado para estándares de cTnT. En la configuración tipo sándwich implementada, una mayor cantidad de cTnT se traduce en una mayor cantidad de anticTnT-HRP inmovilizada sobre las Strp-MBs modificadas, obteniéndose así una mayor respuesta amperométrica. La curva de calibrado obtenida (**Figura 55**), presenta un rango de linealidad ($r = 0.996$) comprendido entre 0.05 y 1 ng mL^{-1} , con una pendiente de $(6.8 \pm 0.2) \times 10^{-7} \text{ A ng}^{-1} \text{ mL}$ y una ordenada en el origen de $(0.6 \pm 0.1) \times 10^{-7} \text{ A}$.

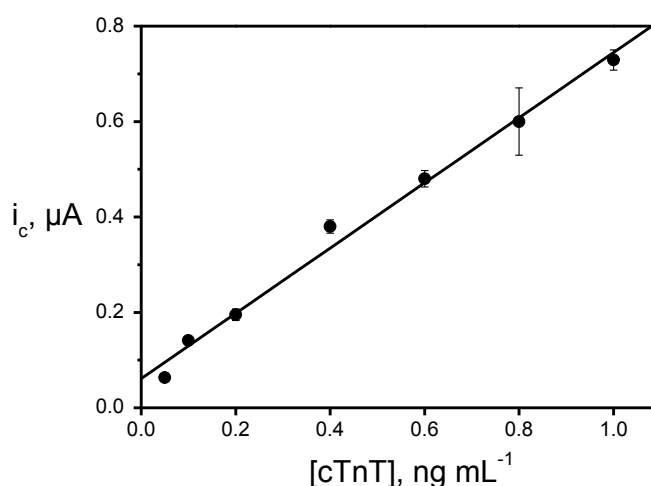


Figura 55. Curva de calibrado obtenida para estándares de cTnT (preparados en PBS 10 mM de pH 7.5) con el magnetoinmunsensor tipo sándwich desarrollado. Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 16. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

El LD y el límite de cuantificación obtenidos, calculados de acuerdo con los criterios $3s_b/m$ y $10s_b/m$, donde m era la pendiente del calibrado y s_b se estimó como la desviación estándar ($n = 10$) de las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia de cTnT, fueron de 0.017 y 0.055 ng mL^{-1} , respectivamente. Es de destacar que el LD obtenido fue diez veces inferior al descrito para otros inmunsensores amperométricos de cTnT [Silva, 2010], y seis veces inferior al punto de corte clínico recomendado, establecido en 0.1 ng mL^{-1} [Deegan, 2001], por encima del cual existe un posible riesgo de daño de miocardio. Además, los dos únicos inmunsensores

descritos en la bibliografía (ninguno de ellos amperométrico) ([Fonseca, 2011], [Zhang, 2011]) que proporcionan mejores LDs que el conseguido con este inmunosensor requieren tiempos de análisis entre 9 y 12 veces más largos.

La reproducibilidad de las medidas amperométricas obtenidas con distintos magnetoinmunosensores preparados de la misma forma ($n = 7$) se evaluó a dos niveles de concentración de cTnT, 0.5 y 1 ng mL⁻¹, resultando unos valores de RSD del 7.1 y 2.1 % respectivamente, lo que demuestra que el procedimiento de fabricación del inmunosensor es fiable y que se pueden obtener respuestas amperométricas reproducibles con distintos inmunosensores preparados de la misma manera.

Aunque la metodología descrita en este trabajo disminuye el tiempo de inmovilización y bloqueo hasta tan sólo 45 min, todavía se necesitan 75 min para que transcurran las reacciones inmunológicas antes de llevar a cabo la medida amperométrica. Con objeto de reducir el tiempo de análisis y puesto que las reacciones de reconocimiento se llevan a cabo sobre la superficie de Strp-MBs y la detección electroquímica sobre la superficie de los SPAuEs, se estudió la estabilidad con el tiempo de las MBs modificadas con el anticuerpo de captura (MBs-biotin-anticTnT) o con el inmunocomplejo completo (MBs-biotin-anticTnT-cTnT-anticTnT-HRP) con el fin de estudiar la posibilidad de tenerlas preparadas y almacenadas y transportarlas al lugar del análisis o realizar la medida amperométrica en el momento deseado.

Estos estudios de estabilidad se llevaron a cabo a tres temperaturas diferentes (4, 25 y 37 °C) conservando las MBs-biotin-anticTnT en disolución PBS a pH 7.5, y las MBs-biotin-anticTnT-cTnT-anticTnT-HRP en disolución TP a pH 7.0. Los gráficos de control del tiempo de vida útil (no mostrados) se construyeron estableciendo como valor de referencia el valor medio de las medidas amperométricas ($n = 3$) registradas el primer día de estudio, y como límites superior e inferior los valores correspondientes a $\pm 3s$ de dicho valor. Se observó que las MBs-biotin-anticTnT se mantenían estables durante tres días a 4 °C, y sólo 24 h si se conservaban a 25 ó 37 °C y que las MBs-biotin-

anticTnT-cTnT-anticTnT-HRP sólo eran estables durante algunas horas independientemente de la temperatura de conservación.

4.3.1.3. Estudio de interferencias

Para evaluar la selectividad del magnetoinmunosensor frente a la cTnT, se ensayaron como controles negativos la cTnI y otras proteínas no específicas (BSA, IgG y dímero-D) presentes en muestras de suero humano. Este estudio se llevó a cabo comparando las respuestas amperométricas obtenidas con el inmunosensor, para 1 ng mL^{-1} de cTnT, en ausencia o presencia de los interferentes mencionados (**Figura 56**). En el caso de la cTnI, que se estudió al mismo nivel de concentración que la cTnT, se observó una acusada disminución de la señal amperométrica, lo que podría atribuirse a que el anticuerpo de detección presentase reactividad cruzada frente a la cTnI y que parte del anticuerpo se estuviese uniendo a ella quedando menos cantidad disponible para reaccionar con la cTnT. Otra posibilidad era que el anticuerpo de captura estuviese reconociendo ambos marcadores cardiacos pero el de detección sólo la cTnT. Por su parte, el BSA y el dímero-D se estudiaron en un exceso de concentración, no interfiriendo en la determinación de cTnT.

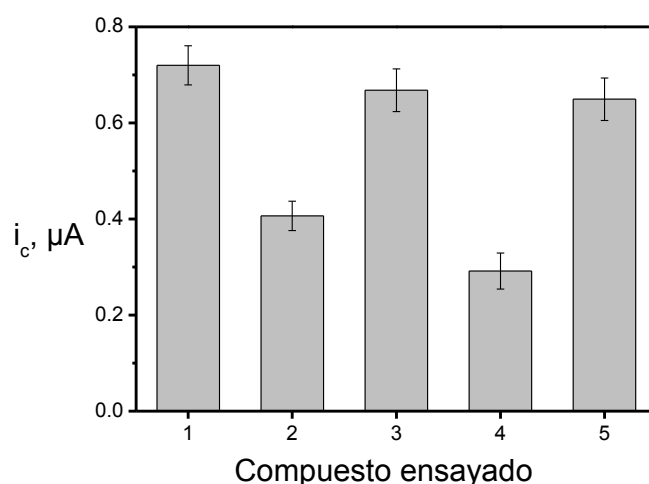


Figura 56. Especificidad del inmunosensor frente a cTnT. Valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos para 1 ng mL^{-1} de cTnT en ausencia (1) o en presencia de 1 ng mL^{-1} de cTnI (2), 266 mg mL^{-1} de BSA (3), 60 mg mL^{-1} de IgG (4) y 0.04 mg mL^{-1} de dímero-D (5). Condiciones experimentales descritas en la Tabla 16. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Sin embargo, al realizar la incubación de la cTnT con un gran exceso de IgG se observaba una interferencia significativa en la determinación del marcador cardiaco de interés. Esto puede ser atribuido a la interferencia descrita de los anticuerpos anti-ratón humanos (HAMAs) en la determinación de marcadores cardiacos empleando formatos de inmunoensayo tipo sándwich que usen anticuerpos monoclonales de ratón [Levinson, 2002], ya que estos HAMAs pueden unirse con una elevada afinidad a una amplia gama de IgGs y a los anticuerpos de captura o de detección en ausencia de antígeno.

En cuanto a la heparina, aunque se ha descrito que puede disminuir la inmunoreactividad de las troponinas debido a que posee una alta densidad de cargas negativas en los polianiones, lo que puede permitir su unión a las troponinas cargadas positivamente [Gerhardt, 2000], no se observó diferencia entre las respuestas amperométricas obtenidas para 1 ng mL^{-1} de cTnT en ausencia y presencia de un exceso de heparina (45 U mL^{-1}), lo que confirmó la posibilidad de determinar la cTnT en muestras con elevados contenidos de heparina.

4.3.1.4. Aplicación al análisis de muestras de suero humano enriquecidas

La determinación de marcadores cardiacos suele llevarse a cabo en muestras de sangre, suero, plasma o saliva. Teniendo en cuenta los buenos resultados obtenidos con el magnetoinmunosensor desarrollado, se decidió demostrar su aplicabilidad mediante el análisis de muestras de suero humano enriquecidas en cTnT. Sin embargo, al aplicar el procedimiento descrito para los patrones no se obtuvieron resultados satisfactorios, lo que se atribuyó a una posible interferencia de algún componente de la muestra. Por lo tanto, para el análisis de las mismas se aplicó un procedimiento experimental diferente, explicado en la Parte Experimental de esta memoria, y consistente en la formación del inmunocomplejo en una etapa previa a su inmovilización sobre las Strp-MBs. Con este procedimiento se observó una menor sensibilidad del magnetoinmunosensor hacia los constituyentes interferentes del suero. Para evaluar el posible efecto matriz de la muestra, se construyeron calibrados en muestras de suero enriquecidas con cTnT ($12.5\text{--}50 \text{ ng mL}^{-1}$) (Figura 57b), sometidas

a diferentes diluciones (10, 25, 50, 75 y 100 veces) con disolución PBS a pH 7.5 y suplementadas con ambos anticuerpos de acuerdo con el protocolo descrito en el Apdo. 3.3.6.3.a.

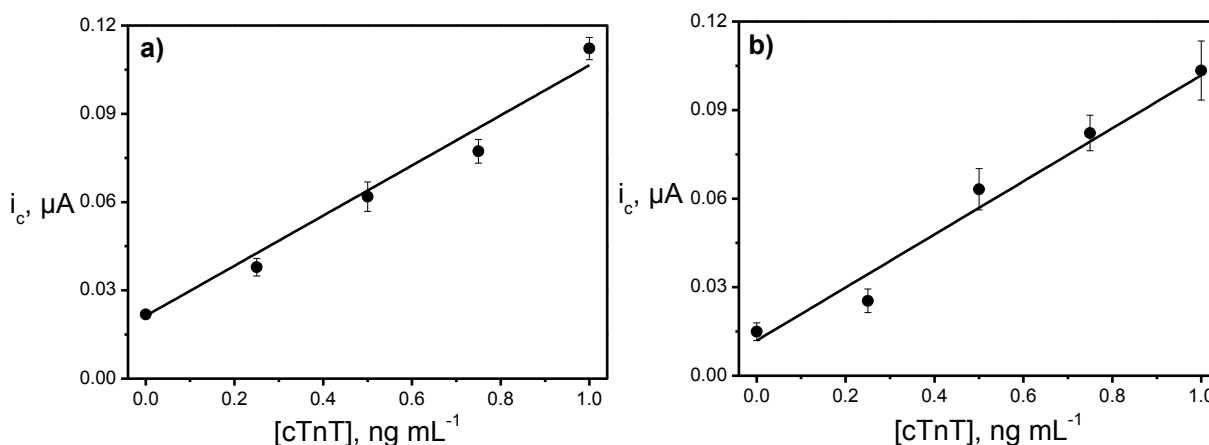


Figura 57. Curvas de calibrado obtenidas aplicando el protocolo descrito en el Apdo. 3.3.6.3.a con el magnetoinmunosensor desarrollado para los estándares de cTnT (preparados en PBS 10 mM de pH 7.5) (a) y para las muestras de suero suplementadas con cTnT y diluidas 50 veces (b). Condiciones experimentales descritas en la Tabla 16. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Mediante la comparación estadística de los valores de las pendientes obtenidas con dichos calibrados realizados en suero diluido, con el valor de la pendiente obtenida en un calibrado realizado con estándares en las mismas condiciones experimentales (**Figura 57a**), se demostró la existencia de un efecto matriz significativo en muestras sin diluir, que se minimizaba al aplicar una dilución de 50 veces, sin observarse una mejora significativa para diluciones superiores a ésta.

En consecuencia, la determinación de cTnT en las muestras de suero se realizó mediante interpolación de las señales amperométricas obtenidas con el suero enriquecido y diluido 50 veces en el calibrado realizado con muestras de suero diluidas 50 veces (**Figura 56b**). En el análisis realizado de 7 muestras de suero enriquecidas con $20\ ng\ mL^{-1}$ de cTnT y diluidas 50 veces se obtuvo (para un intervalo de confianza de $\alpha = 0.05$) una concentración media de $(0.36 \pm 0.04)\ ng\ mL^{-1}$ de cTnT y un porcentaje de recuperación del $(91 \pm 7)\ \%$, datos que pueden considerarse buenos teniendo en cuenta la sencillez y rapidez del análisis.

Es importante mencionar que, a pesar de que es necesario diluir la muestra para la determinación de la cTnT, los resultados obtenidos demuestran la posibilidad de utilizar la metodología descrita para detectar que se ha producido un AMI, ya que los niveles de este marcador cardiaco aumentan hasta 50 ng mL⁻¹ pocas horas después del episodio [Melanson, 2007].

4.3.1.5. Determinación de troponina T cardiaca en flujo empleando un chip de microfluídica

El formato de inmunoensayo tipo sándwich descrito se implementó para la determinación de cTnT en flujo empleando un chip de microfluídica que contenía seis superficies sensoras y que estaba acoplado a una plataforma de multidetección, descrita en el Apdo. 3.1.2 de la Parte Experimental.

Tras bloquear el sistema con BSA al 2 % (p/v), para el correcto funcionamiento de los chips, debía realizarse una activación electroquímica, consistente en aplicar ocho pasos de potencial consecutivos (entre -2.0 y 0.0 V) de 10 s cada uno, en medio acuoso KNO₃ 0.1 M. Seguidamente, se caracterizaba la superficie electródica, realizándose voltamperogramas cíclicos entre -0.3 y +0.3 V a 50 mV s⁻¹ en medio K₄Fe(CN)₆·3H₂O/K₃Fe(CN)₆ 2 mM (preparado en KNO₃ 0.1 M), y aplicando diferentes velocidades de flujo (5, 10, 20, 40, y 75 µL min⁻¹) [Godino, 2010]. En la **Figura 58** se muestran los voltamperogramas cíclicos registrados a diferentes velocidades de flujo, así como la relación lineal existente entre la intensidad de corriente registrada en estado estacionario y la raíz cúbica de la velocidad de flujo, de acuerdo con la ecuación de Levich para un microelectrodo, en unidades del sistema internacional [Compton, 1993]:

$$I = 0.925nFcw(x_e D)^{2/3} \left(\frac{Q}{h^2 d} \right)^{1/3} \quad (3)$$

donde n es el número de electrones implicados, F es la constante de Faraday, c y D la concentración y el coeficiente de difusión de las especies electroactivas, x_e y w la

longitud y anchura del electrodo, d y h la anchura y altura media del canal, respectivamente, y Q el caudal volumétrico.

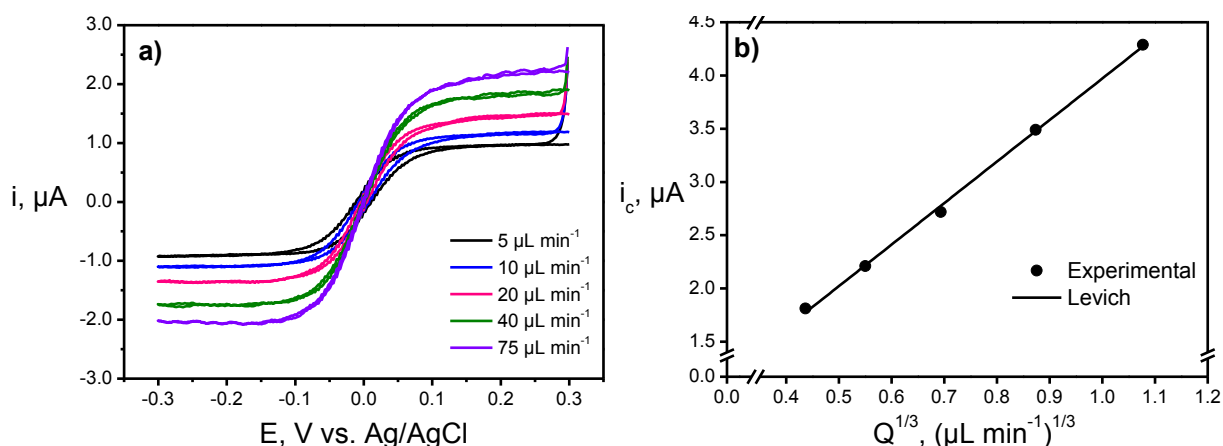


Figura 58. Caracterización electroquímica del chip de microfluídica realizada en una disolución de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 2 mM (preparada en KNO_3 0.1 M): voltamperogramas cíclicos registrados entre -0.3 y $+0.3$ V a 50 mV s^{-1} en un intervalo de velocidad de flujo comprendido entre 5 y $75 \mu\text{L min}^{-1}$ a) y representación correspondiente al diagrama de Levich b).

Esta caracterización electroquímica permitía comprobar el buen estado de la superficie de cada electrodo de trabajo una vez realizada su activación [Ordeig, 2006].

Las Strp-MBs modificadas con el inmunocomplejo de cTnT (de acuerdo con el protocolo descrito en el Apdo. 3.3.4.1.1 de la Parte Experimental), se resuspendieron en 500 μL de PBS a pH 7.5 y se introdujeron en el sistema (previamente bloqueado y activado), quedando capturadas magnéticamente sobre cada uno de los electrodos de inmovilización del chip gracias a la ayuda de los imanes de neodimio colocados bajo su superficie. Una vez introducidas las MBs, el chip (contenido en la carcasa compuesta por los canales de microfluídica, las conexiones eléctricas, y el soporte móvil con los seis imanes) se conectaba al potenciostato y, tras hacer pasar (a $5 \mu\text{L min}^{-1}$) la disolución reguladora PBS a pH 7.5 o la disolución comercial de TMB- H_2O_2 , se realizaba la medida cronoamperométrica (-0.10 V vs Ag/AgCl), registrándose la reducción enzimática del H_2O_2 mediada por el TMB durante 200 s. En este caso, el criterio de medida escogido fue la diferencia entre la intensidad de corriente obtenida al pasar la disolución reguladora PBS a pH 7.5 y la de sustrato enzimático.

En la **Figura 59** se muestran a modo de ejemplo los cronoamperogramas obtenidos en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de cTnT. Como puede observarse, en ausencia de antígeno no se obtenía casi corriente catódica, demostrándose la ausencia de adsorciones inespecíficas del anticuerpo de detección.

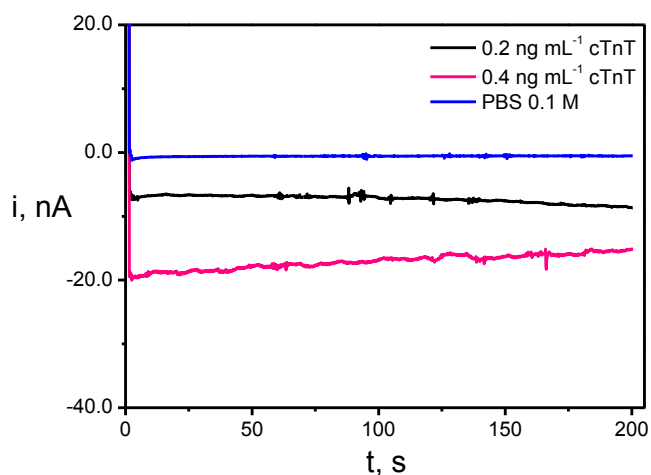


Figura 59. Cronoamperogramas obtenidos con la plataforma de multidetección en ausencia y presencia de distintas concentraciones de cTnT (0.2 y 0.4 ng mL⁻¹). Condiciones experimentales descritas en la Tabla 16.

4.3.1.5.1. Curva de calibrado y características analíticas

Empleando las condiciones experimentales optimizadas para el magnetoinmunoensayo de cTnT (recogidas en la **Tabla 16**), se construyó un calibrado para la detección de cTnT en flujo con el chip de microfluídica. Como puede observarse en la **Figura 60**, en estas condiciones era posible la determinación del marcador cardíaco en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.05 y 1.0 ng mL⁻¹ ($r = 0.986$) con una pendiente de (38 ± 3) nA ng⁻¹ mL y una ordenada en el origen de (2.0 ± 1.5) nA.

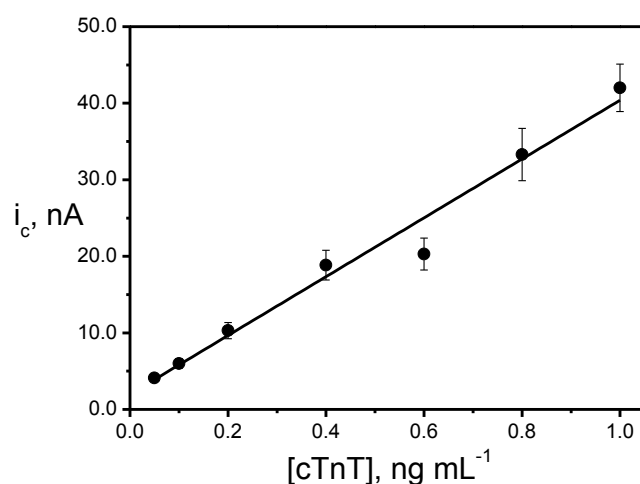


Figura 60. Curva de calibrado obtenida para cTnT con el magnetoinmunoensayo tipo sándwich acoplado a la plataforma de microfluídica. Condiciones experimentales descritas en la Tabla 16. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Con la metodología descrita, se consiguieron límites de detección y de determinación muy bajos (0.03 y 0.11 ng mL^{-1} , respectivamente), de acuerdo con el criterio $3s_b/m$ y $10s_b/m$, donde m era la pendiente del calibrado y s_b se estimó como la desviación estándar ($n = 10$) de las respuestas cronoamperométricas obtenidas para 0.05 ng mL^{-1} de cTnT. La reproducibilidad de las medidas realizadas con el chip de microfluídica se evaluó mediante el registro de las medidas cronoamperométricas obtenidas con varios magnetoinmunosensores ($n = 5$) preparados de la misma forma en distintos días, para un valor de cTnT de 0.4 ng mL^{-1} , obteniéndose un valor de RSD del 10.3 %.

4.3.1.5.2. Aplicación al análisis de muestras de suero humano

Una vez comprobada la posibilidad de determinar cTnT empleando la plataforma descrita, se demostró la validez del sistema mediante el análisis de muestras de suero humano enriquecidas con el antígeno (50 ng mL^{-1} de cTnT) y diluidas 50 veces con PBS a pH 7.5, aplicando el protocolo descrito en los Apdos. 3.3.4.1.2 y 3.3.6.3.a).

Como puede observarse en la **Figura 61**, la respuesta obtenida con la muestra así preparada fue dos veces superior a la obtenida con la muestra de suero sin

contaminar, lo que confirmaba la posibilidad de determinar concentraciones clínicamente relevantes de este marcador cardíaco.

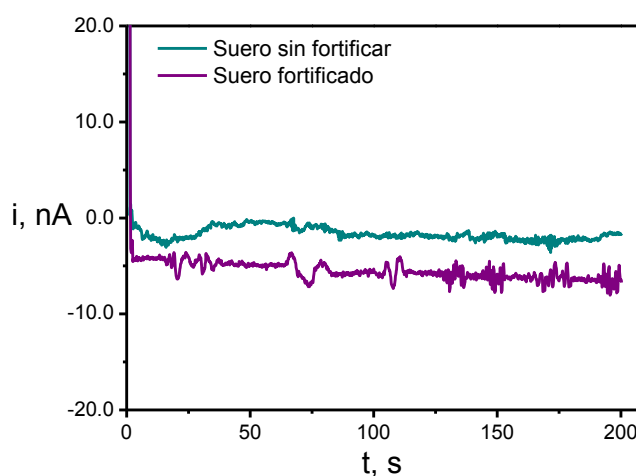


Figura 61. Cronoamperogramas obtenidos con la plataforma de multidetección para muestras de suero sin contaminar y enriquecidas con 50 ng mL^{-1} de cTnT y diluidas 50 veces con PBS 10 mM a pH 7.5. Condiciones experimentales descritas en la Tabla 16.

Estos estudios preliminares demostraron que empleando la plataforma desarrollada podrían detectarse de forma rápida, específica y fiable incrementos drásticos en los niveles de cTnT en muestras de suero humano, lo que permitiría realizar un diagnóstico inequívoco de AMI.

4.3.2. MAGNETOINMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL N-TERMINAL

Se ha desarrollado un magnetoinmunosensor de tipo competitivo indirecto para llevar a cabo la determinación de NT-proBNP, cuyo protocolo de fabricación, ha sido descrito y esquematizado en la Parte Experimental (Apdo. 3.3.4.2). Brevemente, consistía en la inmovilización covalente del NT-proBNP sobre la superficie de HOOC-MBs (previamente activada con EDC/sulfo-NHS, como se esquematiza en la **Figura 62**). Tras una etapa de bloqueo de los grupos activados residuales con etanolamina, las NT-proBNP-MBs se incubaban con una disolución que contenía una cantidad variable de NT-proBNP y fija de antiNT-proBNP-HRP, produciéndose la etapa de competición entre el antígeno inmovilizado y el libre por los sitios de unión al anticuerpo de detección. Las partículas modificadas con el inmunocomplejo se resuspendían en la disolución de medida y se colocaban sobre la superficie de SPAuEs, iniciando la amperometría (-0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag, variable optimizada previamente, Apdo. 4.3.1.1) y monitorizando la variación de la corriente catódica a los 200 s de la adición de 5 μ L de la disolución comercial de TMB- H_2O_2 .

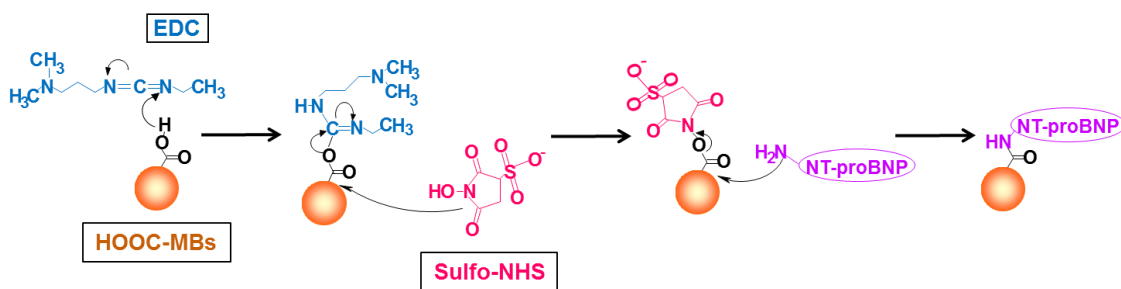


Figura 62. Esquema de activación de las HOOC-MBs con EDC/sulfo-NHS y la posterior inmovilización covalente del NT-proBNP.

4.3.2.1. Optimización de variables experimentales

Todas las variables experimentales implicadas en la fabricación de este magnetoinmunosensor se optimizaron tomando como criterio de selección el valor del cociente que resulta entre la señal amperométrica obtenida en ausencia de analito (i_0)

y en presencia de $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de NT-proBNP ($i_{0.2}$), concentración con la que se garantizaba un cambio de corriente significativo debido a la inmunoreacción competitiva. En la **Tabla 17** se muestran los intervalos de estudio de cada una de las variables experimentales, así como los valores seleccionados como óptimos.

Tabla 17. Optimización de variables experimentales.

Variable experimental	Intervalo de estudio	Valor seleccionado
$V_{\text{HOOC-MBs}}, \mu\text{L}$	2–6	3
$[\text{NT-proBNP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	0–25	5
$[\text{antiNT-proBNP-HRP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	0.5–2	1
$t_{\text{NT-proBNP}}, \text{min}$	15–120	60
$t_{\text{inc}}, \text{min}^a$	15–60	30
$t_{\text{competición}}, \text{min}$	15–60	45
$V_{\text{TMB-H}_2\text{O}_2}, \mu\text{L}$	1–10	5

^a Tiempo de incubación de la muestra/antiNT-proBNP-HRP

Concentración de NT-proBNP y antiNT-proBNP-HRP

En primer lugar, y tomando como criterio de selección la relación citada ($i_0/i_{0.2}$), se optimizó la concentración de NT-proBNP inmovilizado sobre la superficie de las HOOC-MBs. Como puede observarse en la **Figura 63a**, se obtuvo un aumento de la relación $i_0/i_{0.2}$ hasta $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de analito, valor a partir del cual se observó una ligera disminución. Este comportamiento puede atribuirse a impedimentos estéricos para la unión del anticuerpo, y a que, por tratarse de un formato competitivo indirecto, elevadas concentraciones de antígeno inmovilizado requieren mayores concentraciones de antígeno libre para producir una competición significativa, así como a un posible aumento de la resistencia a la transferencia electrónica en presencia de altas concentraciones del antígeno inmovilizado.

La influencia de la concentración del anticuerpo de detección sobre la relación de señales considerada se estudió en el intervalo comprendido entre 0.5 y $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, encontrándose la relación $i_0/i_{0.2}$ más favorable para $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de antiNT-proBNP-HRP

(Figura 63b). El acusado descenso de esta relación para valores mayores se debe probablemente a que concentraciones de anticuerpo mayores que la concentración de saturación requerirían mayores concentraciones de antígeno para producir un proceso competitivo detectable.

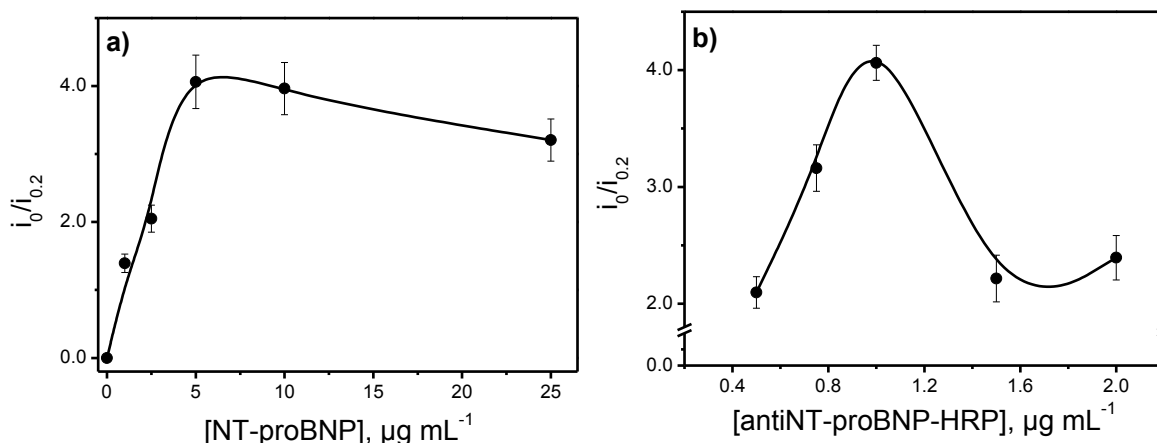


Figura 63. Dependencia de la relación $i_0/i_{0.2}$ con las concentraciones de NT-proBNP inmovilizado sobre las HOOC-MBs (a), y de antiNT-proBNP-HRP (b). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M de pH 7.0; $V_{\text{HOOC-MBs}} = 4 \mu\text{L}$; $[\text{NT-proBNP}] = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (b); $[\text{antiNT-proBNP-HRP}] = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$ (a); $t_{\text{NT-proBNP}} = 60 \text{ min}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$; $t_{\text{competición}} = 45 \text{ min}$; $V_{\text{inc}} = 25 \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Volumen HOOC-MBs

A continuación se optimizó el volumen de la suspensión comercial de HOOC-MBs. Como puede observarse en la **Figura 64** la relación $i_0/i_{0.2}$ aumentaba con el volumen de partículas hasta $3 \mu\text{L}$ y disminuía de manera drástica para volúmenes superiores, probablemente debido a una peor transferencia electrónica [Loaiza, 2008], por lo que decidió trabajar con un volumen de $3 \mu\text{L}$.

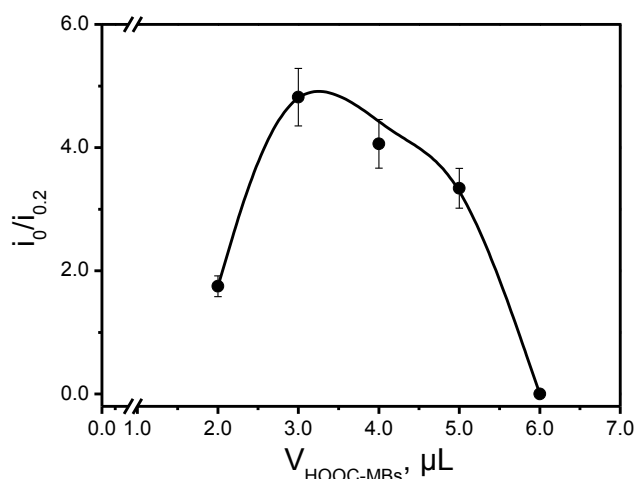


Figura 64. Dependencia de la relación $i_0/i_{0,2}$ con el volumen de la suspensión comercial de HOOC-MBs. Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; [NT-proBNP] = 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$; [antiNT-proBNP-HRP] = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $t_{\text{NT-proBNP}}$ = 60 min; t_{inc} = 30 min; $t_{\text{competición}}$ = 45 min; V_{inc} = 25 μL ; E_{app} = -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a 3 \times s (n = 3).

Tiempos de incubación

Asimismo, se estudiaron los tiempos de incubación de todas las etapas implicadas en la preparación del magnetoinmunosensor. El tiempo de incubación con la disolución de NT-proBNP para su inmovilización sobre las HOOC-MBs se estudió en el intervalo comprendido entre 0 y 120 min y, como se muestra en la **Figura 65a**, la relación aumentaba con el tiempo de incubación hasta 60 min, tiempo a partir del cual disminuía debido posiblemente a que un aumento en la cantidad de NT-proBNP inmovilizado sobre las HOOC-MBs requería una concentración superior de antígeno libre para producir una competición significativa.

Análogamente se optimizó el tiempo de competición y el tiempo de preincubación de la mezcla de NT-proBNP libre y antiNT-proBNP-HRP, seleccionándose como valores óptimos 45 y 30 min, respectivamente (**Figura 65b y 65c**). El hecho de que a partir de 30 min de incubación de la mezcla que contenía antígeno libre y el anticuerpo de detección se observara una disminución de la relación puede deberse a un proceso de disociación entre antígeno y anticuerpo, traducándose en una menor competición.

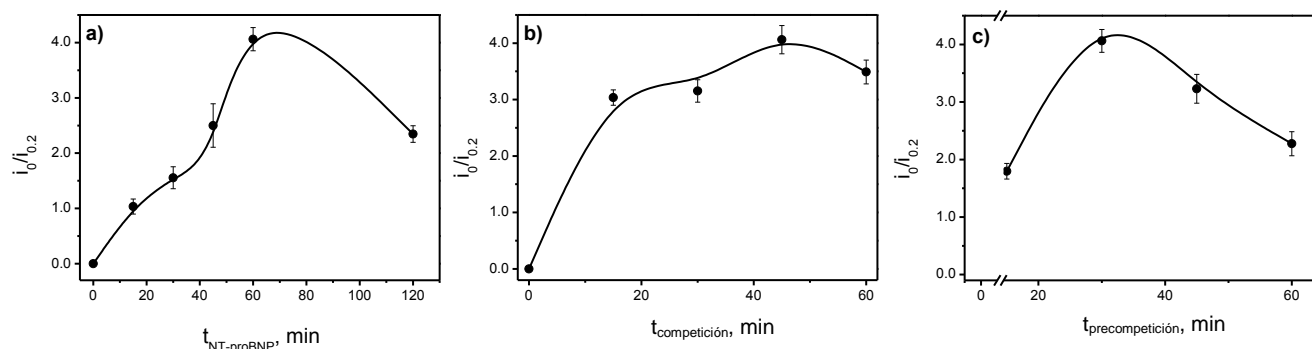


Figura 65. Dependencia de la relación $i_0/i_{0,2}$ con el tiempo de incubación con la disolución de NT-proBNP (a), de competición (b), y de preincubación de la muestra con el antiNT-proBNP-HRP (c). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $V_{HOOC-MBs} = 3 \mu L$; [NT-proBNP] = $5 \mu g mL^{-1}$; [antiNT-proBNP-HRP] = $1 \mu g mL^{-1}$; $t_{NT-proBNP} = 60$ min (b y c); $t_{preincubación} = 30$ min; $t_{competición} = 45$ min; $V_{inc} = 25 \mu L$; $E_{app} = -0.10$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

4.3.2.2. Características analíticas y estabilidad

Trabajando en las condiciones experimentales optimizadas, se construyó un calibrado para estándares de NT-proBNP preparados en PBST a pH 7.5, representando las señales normalizadas (S_n , de acuerdo a la expresión descrita en el Apdo. 4.2.2. (1)) frente a la concentración de analito, expresada en escala logarítmica (**Figura 66**). Como se ha explicado anteriormente, en inmunoensayos competitivos no existe una relación lineal entre la intensidad de corriente medida y la concentración de analito. Además, a mayor cantidad de antígeno en disolución, menor cantidad de anticuerpo marcado queda disponible para reaccionar con el NT-proBNP inmovilizado sobre las MBs, lo que se traduce en una disminución de la señal amperométrica obtenida al aumentar la concentración de antígeno objetivo. Consecuentemente, la curva de calibrado obtenida se ajustó a la ecuación paramétrica descrita para este tipo de inmunoensayos (Apdo. 4.2.2.).

Los parámetros característicos obtenidos fueron un IC_{50} de $7.43 ng mL^{-1}$ y un IL comprendido entre 0.73 y $67.30 ng mL^{-1}$ (calculado como el intervalo de concentraciones que producen entre el 20 y 80 % de la señal amperométrica máxima).

El LD, estimado como la concentración de analito que origina una disminución de la señal respecto al blanco de un 10 %, fue de 0.21 ng mL^{-1} .

La comparación de las respuestas amperométricas proporcionadas para estándares de 7.5 ng mL^{-1} de NT-proBNP por nueve magnetoinmunosensores diferentes preparados de la misma manera el mismo día confirmó la reproducibilidad de las medidas amperométricas y la fiabilidad de fabricación del magnetoinmunosensor ($\text{RSD} = 9.7 \%$).

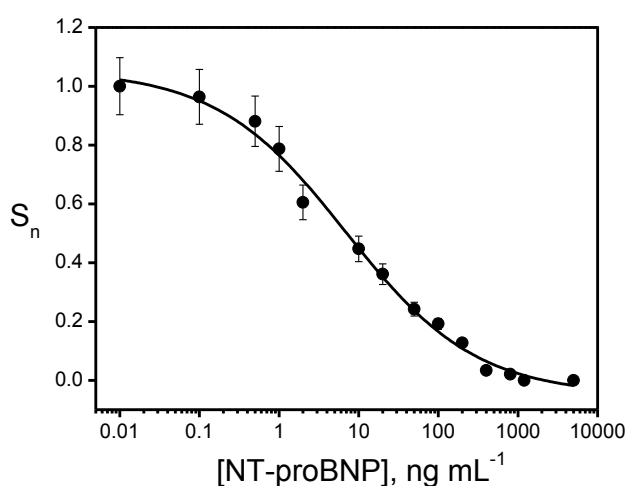


Figura 66. Curva de calibrado construida para estándares de NT-proBNP (preparados en disolución reguladora PBST 10 mM a pH 7.5). Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 17. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

La estabilidad con el tiempo de las MBs modificadas con NT-proBNP y bloqueadas con etanolamina se estudió almacenándolas resuspendidas en $50 \mu\text{L}$ de PBST filtrado y a 4°C . Cada día de estudio se controlaba la respuesta del magnetoinmunosensor para disoluciones que contenían 0 y 7.5 ng mL^{-1} de NT-proBNP, de acuerdo con el protocolo experimental descrito. Las respuestas amperométricas obtenidas en ausencia y presencia de antígeno libre se representaron en un gráfico de control, en el que se establecieron como valores de referencia los valores medios de la medidas amperométricas ($n = 3$) registradas el primer día de estudio para ambas concentraciones de NT-proBNP, y como límites superior e inferior los valores correspondientes a $\pm 3s$ de dicho valor.

Como puede observarse (**Figura 67**), las NT-proBNP-MBs conservadas en las condiciones descritas proporcionaron respuestas amperométricas incluidas dentro de los límites de control durante 12 días, resultados que demostraban la posibilidad de almacenar las HOOC-MBs preparadas durante este periodo hasta el momento en el que se requiera llevar a cabo la determinación.

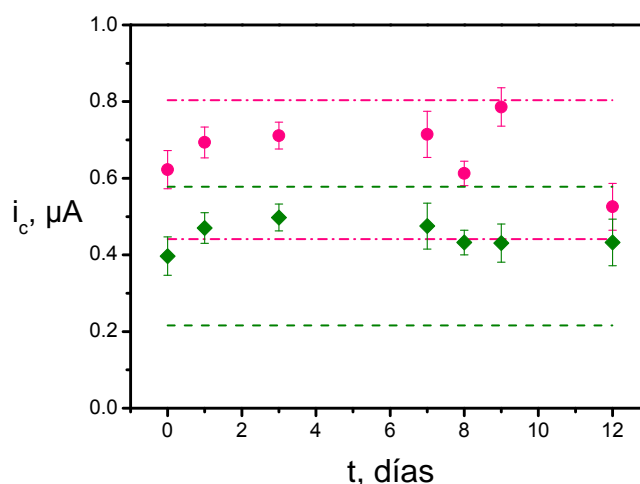


Figura 67. Gráfico de control construido para evaluar la estabilidad de las NT-proBNP-MBs almacenadas a 4 °C en 50 μL de PBST filtrado. Respuestas amperométricas obtenidas en ausencia (color rosa) y presencia de 7.5 $ng\ mL^{-1}$ de antígeno (color verde) en función del tiempo de almacenamiento de las NT-proBNP-MBs. Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 17. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

4.3.2.3. Estudio de interferencias

La selectividad del magnetoinmunoensayo desarrollado se evaluó frente a la proteína cardíaca cTnT y otras proteínas presentes en muestras de plasma y suero humano (BSA, IgG, y dímero-D), así como de heparina. El estudio se realizó comparando las respuestas amperométricas obtenidas con el magnetoinmunoensayo para disoluciones de NT-proBNP 7.5 $ng\ mL^{-1}$ (valor IC_{50}) preparadas en ausencia y presencia de las especies no objetivo seleccionadas, éstas a los niveles de concentración habitualmente encontrados en muestras de suero y plasma. Los resultados, mostrados en la **Figura 68**, demostraron que ninguna de estas proteínas (a los niveles de concentración ensayados) suponía una interferencia significativa en la determinación de NT-proBNP.

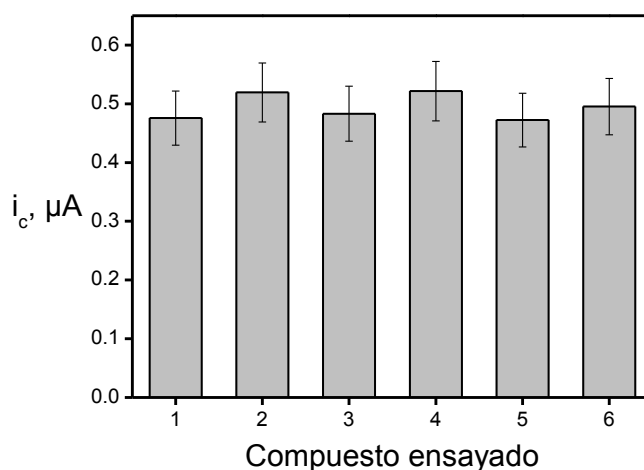


Figura 68. Selectividad del magnetoinmunosensor frente a NT-proBNP. Intensidades de corriente medidas en estado estacionario para disoluciones estándar de 7.5 ng mL^{-1} de NT-proBNP preparadas en ausencia (1) o en presencia de 0.5 ng mL^{-1} de cTnT (2), 0.5 mg mL^{-1} de BSA (3), 1.2 mg mL^{-1} de IgG humana (4), $4.0 \times 10^3 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de heparina (5) y $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de dímero-D (6). Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 17. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

4.3.2.4. Aplicación al análisis de muestras de suero humano

La aplicabilidad de este magnetoinmunosensor para el análisis clínico se evaluó mediante el análisis de muestras de suero humano enriquecidas con concentraciones crecientes de NT-proBNP. Trabajando con suero sin diluir se observó la existencia de un efecto matriz significativo, por lo que se ensayaron diferentes factores de dilución de la muestra con el fin de seleccionar la dilución más apropiada para llevar a cabo la determinación. Dado que una dilución 1/10 era suficiente para minimizar el efecto matriz observado, se trabajó a este nivel para llevar a cabo la determinación de NT-proBNP de acuerdo con el procedimiento descrito en el Apdo. 3.3.6.4. Es importante mencionar que la curva de calibrado obtenida (**Figura 69**) proporcionó mejores características analíticas que la obtenida con los estándares de NT-proBNP, con un IL comprendido entre 0.12 y 42.9 ng mL^{-1} , un IC_{50} de 2.28 ng mL^{-1} y un LD 0.02 ng mL^{-1} , lo que se atribuyó a una minimización de las adsorciones inespecíficas por parte de alguno de los componentes de la muestra de suero.

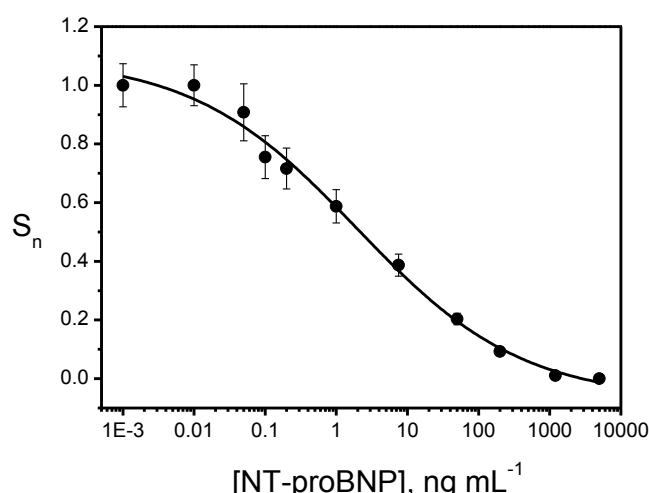


Figura 69. Curva de calibrado obtenida para NT-proBNP en muestras de suero diluidas 1/10 con PBST 10 mM a pH 7.5. Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 17. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Con objeto de demostrar la aplicabilidad del magnetoinmunsensor desarrollado para la determinación de NT-proBNP en este tipo de muestras, se realizaron estudios de recuperación con muestras contaminadas a tres niveles de concentración (0.10, 0.50 y 2.0 ng mL⁻¹). Para ello se interpolaron los valores de las intensidades de corriente obtenidos en estado estacionario para cada una de estas muestras en el calibrado de NT-proBNP construido en suero diluido 10 veces (**Figura 69**). Los resultados obtenidos en el análisis de estas muestras ($n = 5$; $\alpha = 0.05$), recogidos en la **Tabla 18**, demostraron que la metodología desarrollada permite la detección inequívoca de bajos niveles de NT-proBNP, incluso en muestras con concentraciones elevadas de otras proteínas, como BSA o IgG, requiriendo como único pretratamiento una dilución.

Tabla 18. Resultados obtenidos con el magnetoinmunsensor en la determinación de NT-proBNP en muestras de suero humano enriquecidas.

Nivel de concentración (ng mL ⁻¹)	Nivel encontrado (ng mL ⁻¹)	Nivel de recuperación (%)	RSD (%)
0.10	0.11 ± 0.01	111 ± 12	8.8
0.50	0.54 ± 0.06	108 ± 12	8.8
2.0	2.1 ± 0.1	105 ± 6	5.0

Teniendo en cuenta el LD alcanzado y que los diferentes niveles de corte de NT-proBNP establecidos en muestras de suero humano están comprendidos entre 0.25 y 2.0 ng mL⁻¹ [Avello, 2010], el magnetoinmunosensor desarrollado podría utilizarse como una herramienta útil para el análisis de muestras reales, capaz de proporcionar en tan sólo 55 min (una vez preparadas las NT-proBNP-MBs) diagnósticos fiables de insuficiencia cardíaca crónica o de evaluar el grado de una disfunción cardíaca grave o de rechazo tras un trasplante de corazón.

4.3.3. MAGNETOINMUNOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA

Continuando con el objetivo de desarrollar nuevas herramientas para el diagnóstico clínico de biomarcadores cardiacos y empleando el mismo tipo de partículas magnéticas (HOOC-MBs) como superficies de inmovilización, se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico para CRP utilizando un formato tipo sándwich. El protocolo de fabricación del magnetoinmunosensor, así como las condiciones aplicadas durante la medida electroquímica, se han descrito en el Apdo. 3.3.4.3 de la Parte Experimental. Una vez más, se empleó el sistema EDC/sulfo-NHS con el fin de activar los grupos carboxílicos de las partículas y poder inmovilizar covalentemente el anticuerpo de captura. Tras una etapa de bloqueo con etanolamina, se realizaba la etapa de incubación con el antígeno, seguida de una incubación con el anticuerpo de detección biotinilado (biotin-antiCRP) y de su marcaje enzimático con el conjugado de Strp-HRP.

4.3.3.1. Optimización de variables experimentales

Con el objetivo de alcanzar la mayor sensibilidad y el intervalo de linealidad más amplio para la determinación de CRP, se optimizaron todas las variables implicadas en la preparación y el funcionamiento del magnetoinmunosensor, indicadas en la **Tabla 19**, donde se reflejan además los valores seleccionados de cada una de ellas. En el caso del volumen de HOOC-MBs y de disolución de TMB-H₂O₂, se emplearon los valores optimizados en capítulos anteriores para los inmunosensores de NT-proBNP y cTnT, respectivamente.

Tabla 19. Optimización de variables experimentales involucradas en la preparación y funcionamiento del magnetoinmunsensor de CRP.

Variable experimental	Intervalo de estudio	Valor seleccionado
$V_{\text{HOOC-MBs}}, \mu\text{L}^{\text{a}}$	2–6	3
$[\text{antiCRP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	0–100	50
$[\text{biotin-antiCRP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	0–2	1
Factor de dilución del conjugado de Strp-HRP	1:500–1:2000	1:1000
$t_{\text{antiCRP}}, \text{min}$	15–120	60
$t_{\text{CRP}}, \text{min}$	15–60	30
$t_{\text{biotin-antiCRP}}, \text{min}$	15–60	30
$t_{\text{Strp-HRP}}, \text{min}$	15–60	30
$V_{\text{TMB-H}_2\text{O}_2}, \mu\text{L}^{\text{b}}$	1–10	5

^{a,b} Variables experimentales optimizadas en trabajos previos (Apdos. 4.3.2.1. (a) y 4.3.1.1. (b)).

Concentración de antiCRP y de biotin-antiCRP

La influencia de la concentración de los anticuerpos de captura y de detección sobre las señales obtenidas se estudió a un nivel de 1 ng mL^{-1} de CRP. Como puede observarse en la **Figura 70a**, los valores de intensidad de corriente en estado estacionario aumentaban con la concentración de antiCRP hasta $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ y disminuían para concentraciones superiores, probablemente como consecuencia de un impedimento estérico que dificulta la formación de los complejos antígeno-anticuerpo para elevadas concentraciones de anticuerpo de captura inmovilizado. Respecto al anticuerpo de detección, se observó que los valores de intensidad de corriente en estado estacionario aumentaban con la concentración de biotin-antiCRP hasta $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, estabilizándose para valores de concentración superiores (**Figura 70b**), por lo que se seleccionó esta concentración para estudios posteriores.

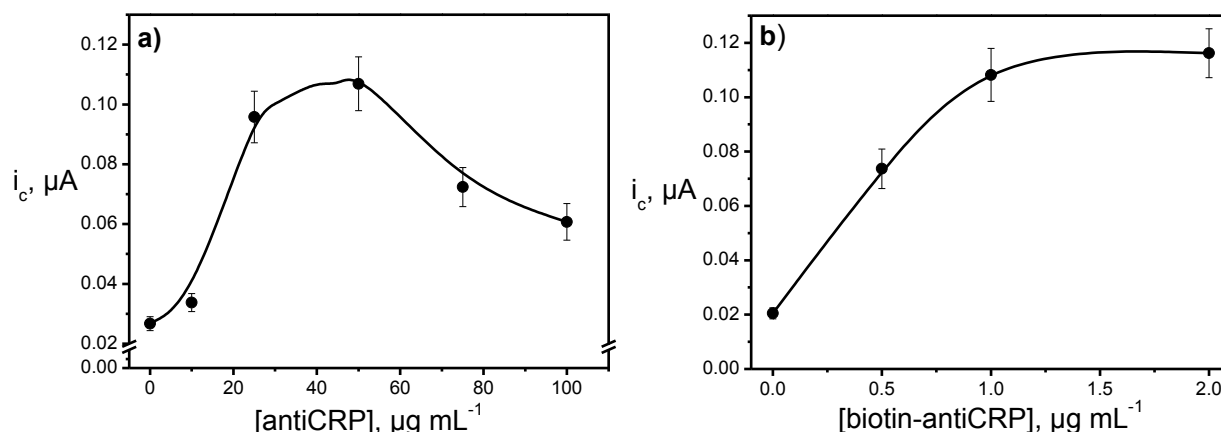


Figura 70. Influencia de la concentración de antiCRP inmovilizado sobre las HOOC-MBs (a) y de la concentración de biotin-antiCRP (b) sobre los valores de corriente obtenidos en estado estacionario con el magnetoinmunosensor desarrollado para estándares de 1 ng mL⁻¹ de CRP. Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $V_{\text{HOOC-MBs}} = 3 \mu\text{L}$; [antiCRP] = 50 µg mL⁻¹ (b); [biotin-antiCRP] = 1 µg mL⁻¹ (a); Factor de dilución de Strp-HRP = 1:1000; $V_{\text{inc}} = 25 \mu\text{L}$; $t_{\text{inc}} = 30$ min; $E_{\text{app}} = -0.10$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Factor de dilución del conjugado de Strp-HRP

Otra variable experimental importante en el desarrollo del magnetoinmunosensor fue el factor de dilución aplicado al conjugado comercial de Strp-HRP para marcar enzimáticamente el anticuerpo de detección mediante un enlace biotina-Strp, ya que la optimización de la concentración del marcador enzimático determina en gran parte la sensibilidad que se alcanza con el sensor desarrollado [Ricci, 2012]. Como se muestra en la **Figura 71**, se estudiaron los factores de dilución 1:500, 1:1000 y 1:2000, registrándose la máxima intensidad de corriente empleando un factor de 1:1000, valor seleccionado para llevar a cabo estudios posteriores.

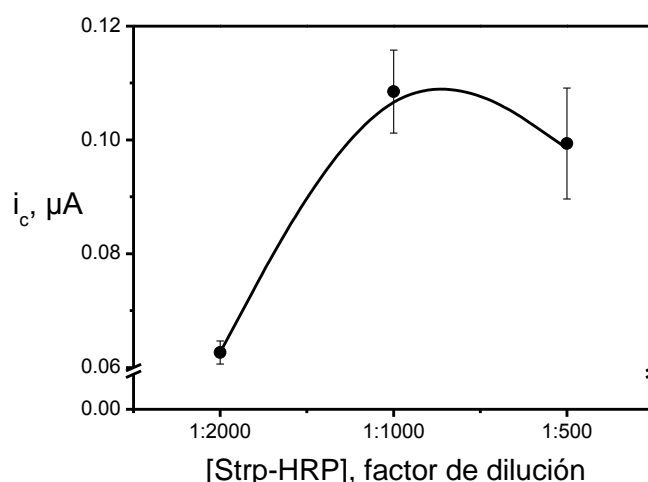


Figura 71. Influencia del factor de dilución del conjugado de Strp-HRP sobre los valores de corriente obtenidos en estado estacionario con el magnetoinmunsensor desarrollado para estándares de 1 ng mL^{-1} de CRP. Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $V_{\text{HOOC-MBs}} = 3 \text{ }\mu\text{L}$; $[\text{antiCRP}] = 50 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; $[\text{biotin-antiCRP}] = 1 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$; $V_{\text{inc}} = 25 \text{ }\mu\text{L}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Número de etapas de incubación y tiempos de incubación

Por otro lado y con el objetivo de intentar disminuir el tiempo de análisis, se estudió la dependencia de las respuestas amperométricas obtenidas con el número de etapas empleadas para fabricar el magnetoinmunsensor. En la **Figura 72** se representan las respuestas amperométricas obtenidas para $1.0 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$ de antígeno, al realizar la incubación con una mezcla de CRP, biotin-antiCRP y Strp-HRP en una única etapa de 45 min (1), al incubar primero con CRP durante 30 min y posteriormente con una mezcla de anticuerpo de detección y marcador enzimático durante otros 30 min (2), y al realizar las tres etapas de incubación por separado durante 30 min cada una (3), protocolo empleado hasta este momento. Como puede observarse, aunque al realizar una única etapa de 45 min podría discriminarse entre ausencia y presencia de $1.0 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$ de CRP (valor de corte establecido para este marcador cardíaco), la mejor respuesta amperométrica se obtuvo al emplear tres etapas independientes, por lo que se decidió continuar con el mismo protocolo aplicado desde el principio con el fin de obtener la mejor sensibilidad posible. Es importante destacar que la corriente medida en ausencia de CRP es independiente del número de etapas de incubación utilizadas.

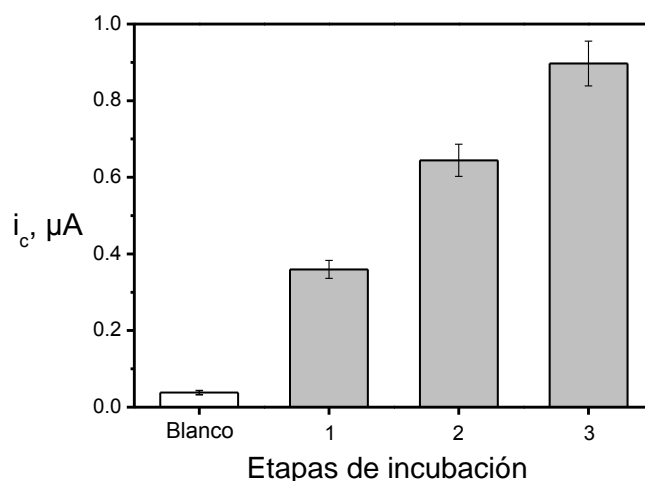


Figura 72. Influencia del número de etapas de incubación empleadas sobre los valores de corriente obtenidos en estado estacionario con el magnetoinmunosensor desarrollado para estándares de 1.0×10^3 (b) ng mL^{-1} de CRP. Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $V_{\text{HOOC-MBs}} = 3 \mu\text{L}$; $[\text{antiCRP}] = 50 \mu\text{g mL}^{-1}$; $[\text{biotin-antiCRP}] = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $\text{Strp-HRP} = 1:1000$; $V_{\text{inc}} = 25 \mu\text{L}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$ (a); $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

El tiempo de las etapas de incubación entre los antígenos y anticuerpos es otra variable importante que condicionará de manera significativa el funcionamiento final del magnetoinmunosensor. Dichas etapas deben tener la duración adecuada para permitir una buena reacción de reconocimiento, pero sin exceder del tiempo que de origen a un debilitamiento de tal inmunoreacción. Así, se estudiaron los tiempos implicados en todas las etapas de incubación comparando las respuestas amperométricas obtenidas para 1 ng mL^{-1} de CRP, seleccionándose para trabajar los valores reflejados en la **Tabla 19**. Estos resultados demuestran que era posible determinar la concentración de CRP en tan solo 90 min, una vez modificadas las HOOC-MBs con el anticuerpo de captura y bloqueadas con etanolamina, lo que supone una gran ventaja en comparación con otras técnicas de análisis que requieren largos periodos de tiempo.

4.3.3.2. Características analíticas y estabilidad

Trabajando en las condiciones optimizadas, se construyó un calibrado para estándares de CRP (preparados en PBST a pH 7.5) (**Figura 73**), obteniéndose una

relación lineal entre la señal amperométrica y el logaritmo de la concentración de antígeno, entre 0.07 y 1.0×10^3 ng mL⁻¹ ($r = 0.997$), con un valor de la pendiente de $(2.03 \pm 0.07) \times 10^{-7}$ A y una ordenada en el origen de $(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-7}$ A. Cabe destacar el amplio intervalo lineal obtenido de más de cuatro órdenes de magnitud.

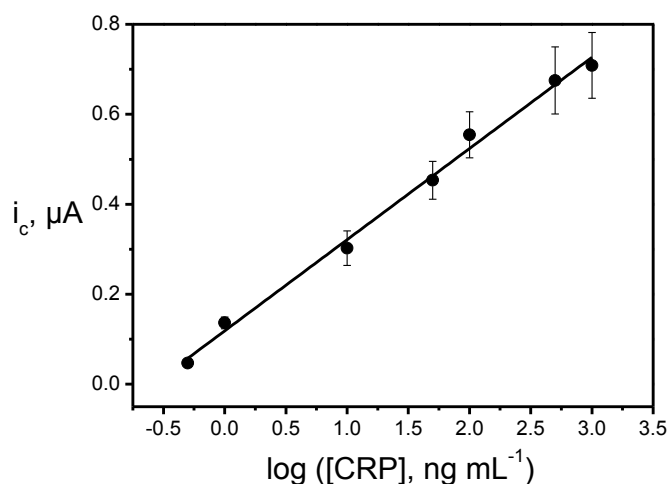


Figura 73. Curva de calibrado construida para estándares de CRP (preparados en PBST 10 mM, pH 7.5). Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 19. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Los valores obtenidos para el LD y el límite de cuantificación, calculados de acuerdo a los criterios $3s_b$ y $10s_b$, donde s_b se estimó como la desviación estándar de diez valores de intensidad de corriente obtenidos en ausencia de CRP fueron 0.021 y 0.07 ng mL⁻¹, respectivamente. Es importante destacar que el LD obtenido fue 48000 veces inferior al punto de corte clínico recomendado en muestras de suero y plasma (1.0×10^3 ng mL⁻¹, [Justino, 2013]) para predecir un riesgo moderado de infarto de miocardio y de accidente cerebrovascular. La elevada sensibilidad alcanzada constituía una gran ventaja para el futuro análisis de muestras reales que pudiesen presentar cierto efecto matriz, ya que éste podría resolverse con una sencilla dilución previa al análisis.

La reproducibilidad de las medidas, evaluada mediante el valor de RSD calculado con las intensidades de corriente obtenidas a un nivel de 5.0×10^2 ng mL⁻¹ de CRP con distintos magnetoinmunosensores ($n = 9$) construidos de la misma forma en el mismo día, fue del 6.5 %, demostrando la fiabilidad del proceso de modificación de las partículas y de la obtención de la medida amperométrica.

También se estudió el tiempo de vida útil de las antiCRP-MBs, conservándolas a 4 °C en PBST filtrado. En la **Figura 74** se representa el gráfico de control obtenido, con los respectivos límites superior e inferior estimados de acuerdo con el criterio $\pm 3s$, donde s corresponde a la desviación estándar del valor medio de 9 medidas, obtenidas el día de preparación de las antiCRP-MBs.

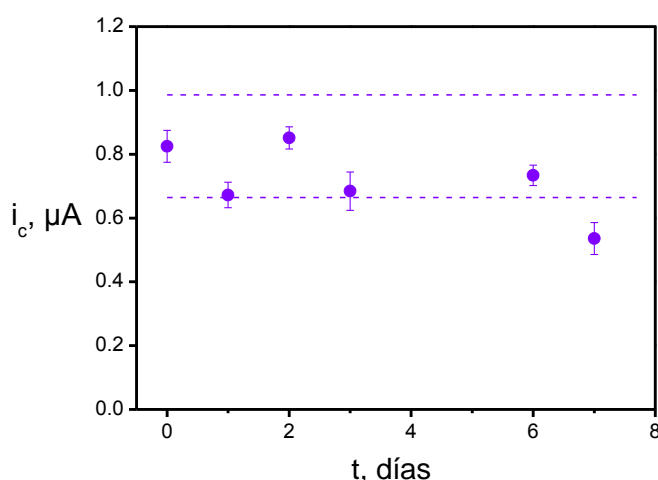


Figura 74. Gráfico de control construido para evaluar la estabilidad de las antiCRP-MBs almacenadas a 4 °C en 50 μL de PBST filtrado. Valores de intensidad de corriente en estado estacionario obtenidos para estándares de 5.0×10^2 ng mL⁻¹ de CRP. Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 19. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Como puede observarse, las antiCRP-MBs pueden emplearse para llevar a cabo la determinación durante los 6 días posteriores a su fabricación.

4.3.3.3. Estudio de interferencias

Para evaluar la selectividad del magnetoinmunoensensor se compararon las respuestas amperométricas que proporcionaba para estándares de 5.0×10^2 ng mL⁻¹ de CRP, en ausencia y en presencia de un exceso de proteínas normalmente presentes en muestras de suero y plasma (BSA, dímero-D), de otros marcadores cardiacos (cTnT y NT-proBNP) y de heparina en las concentraciones indicadas en el pie de la **Figura 75**. Los resultados obtenidos demostraron que era posible la determinación selectiva de CRP en muestras con elevada concentración de otros componentes y biomarcadores cardiacos, lo que reducía en gran medida la posible obtención de falsos negativos a la

hora de realizar un diagnóstico clínico y representaba una enorme ventaja para el desarrollo futuro de plataformas de multidetección.

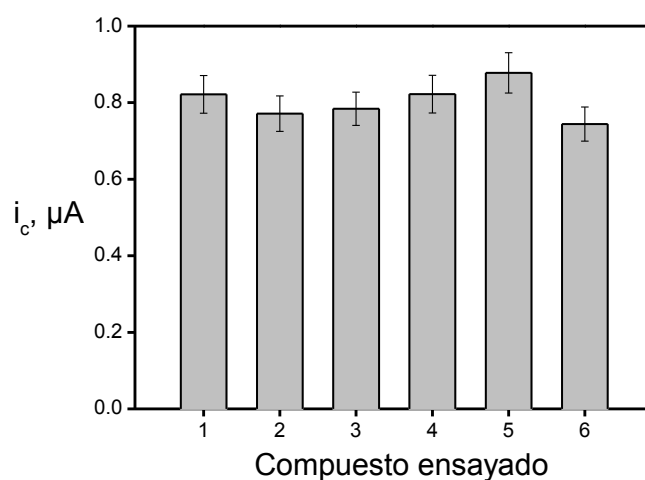


Figura 75. Selectividad del magnetoinmunosensor frente a CRP. Valores de intensidad de corriente proporcionados por el magnetoinmunosensor para estándares de $5.0 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$ de CRP en ausencia (1) y presencia de 5 mg mL^{-1} de BSA (2), 7.5 ng mL^{-1} de NT-proBNP (3), $5.0 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$ de cTnT (4), $5.0 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$ de dímero-D (5) y $4.0 \times 10^2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de heparina (6). Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 19. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Esta elevada selectividad, puede atribuirse al empleo de un formato tipo sándwich con dos anticuerpos de elevada afinidad por la CRP, hecho que se corroboró por el bajo valor de la constante de disociación estimada entre el antígeno y el anticuerpo de captura ($K_d = 4.75 \text{ nM}$).

4.3.3.4. Aplicación al análisis de un material de referencia con un contenido certificado de la proteína

Para demostrar la utilidad del magnetoinmunosensor para el diagnóstico clínico de enfermedades cardiacas, se aplicó al análisis de una muestra de suero humano con un contenido certificado de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CRP, siguiendo el protocolo descrito en el Apdo. 3.3.6.5.

En primer lugar, se realizó un calibrado de adiciones estándar contaminando con concentraciones crecientes de CRP dicho material diluido 20000 veces con PBST a pH 7.5 (**Figura 76**).

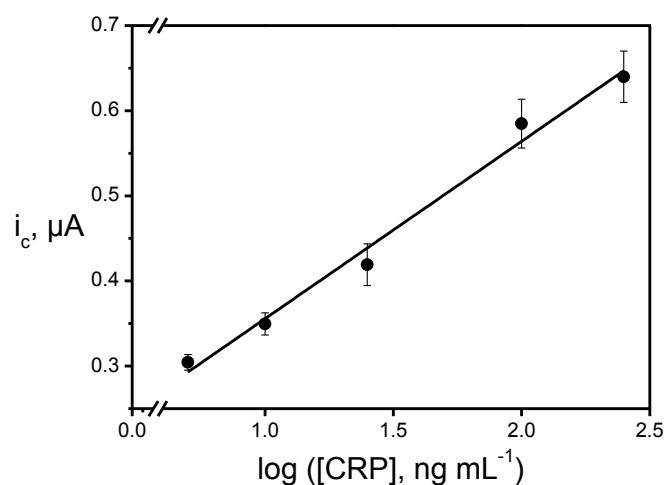


Figura 76. Curva de adiciones estándar de CRP construida en el material de referencia diluido 20000 veces. Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 19. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

El valor de la pendiente obtenido, de $(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-7}$ A, era estadísticamente similar al obtenido con los estándares de CRP, $(2.03 \pm 0.07) \times 10^{-7}$ A, por lo que se determinó que no existía efecto matriz cuando se aplicaba este factor de dilución al material de referencia.

De acuerdo con estos resultados, la determinación de CRP en el material de referencia se realizó interpolando el valor de intensidad de corriente obtenido para diez muestras diluidas 1000 veces (conteniendo 100 ng mL^{-1} de CRP), en el calibrado obtenido para los estándares de CRP (**Figura 73**), encontrándose un valor medio, de $(101 \pm 2) \text{ ng mL}^{-1}$ ($\alpha = 0.05$, RSD = 3.3 %).

La aplicación del test de la t de Student a este resultado, proporcionó una t_{calc} de 0.941, valor inferior al de la t_{tab} , 2.262, para un nivel de significación de 0.05, lo que demostraba que no existían diferencias significativas entre la concentración de CRP determinada con el magnetoinmuno sensor y la certificada.

Cabe destacar que el magnetoinmunosensor desarrollado se puede aplicar a la determinación de este marcador cardíaco en muestras clínicas con un tratamiento mínimo de la muestra (una sencilla dilución en la disolución reguladora de pH) y en un tiempo total de ensayo de unos 90 min, una vez preparadas las antiCRP-MBs. Si, además, se tiene en cuenta el punto de corte clínico establecido para la CRP y la alta sensibilidad de esta metodología, el procedimiento experimental se puede simplificar y acortar llevando a cabo una única etapa de incubación con todos los inmunoreactivos. Asimismo, el uso de biosensores desechables permite la integración de la metodología desarrollada en sistemas portátiles y multiplexados, lo que constituiría una gran ventaja para la implementación final de sistemas POC de diagnóstico clínico.

4.3.4. MAGNETOINMUNOSENSOR DUAL PARA LA DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DEL PÉPTIDO NATRIURÉTICO CEREBRAL N-TERMINAL Y DE LA PROTEÍNA C REACTIVA

Una vez desarrollados los magnetoinmunosensores para la determinación individual de NT-proBNP y CRP, se planteó la posibilidad de determinar ambos marcadores cardiacos simultáneamente en muestras de suero humano, con el objetivo de ofrecer una herramienta de análisis más completa y un diagnóstico más preciso. Así, continuando con el empleo de HOOC-MBs activadas mediante el sistema EDC/sulfo-NHS, se ha desarrollado un magnetosensor dual para detectar NT-proBNP y CRP simultáneamente, aplicando formatos de inmunoensayo de tipo competitivo indirecto y sándwich, respectivamente, y empleando SPdCEs (provistos de dos WEs), como superficies transductoras.

A modo de resumen del protocolo experimental (detallado en el Apdo. 3.3.4.4), las NT-proBNP-MBs y las antiCRP-MBs, una vez bloqueadas con etanolamina, se incubaban en la muestra (que contenía los dos biomarcadores), suplementada 30 min antes con el anticuerpo de detección correspondiente (antiNT-proBNP-HRP o biotin-antiCRP y el conjugado de Strp-HRP). Las MBs resultantes se resuspendían en 5 μ L de disolución TP a pH 7.0 y se capturaban magnéticamente sobre cada uno de los electrodos de trabajo del SPdCE, con ayuda de una carcasa de fabricación casera con dos imanes de neodimio encapsulados y situados debajo de ambas superficies. Una vez depositados 50 μ L de la disolución comercial de TMB-H₂O₂ (diluida 10 veces) sobre la superficie transductora, se registraban los dos amperogramas durante 200 s a un potencial de -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag.

4.3.4.1. Optimización de variables experimentales

Las variables experimentales seleccionadas para la fabricación del magnetoinmunosensor dual, resumidas en la **Tabla 20**, fueron las optimizadas y empleadas para los magnetoinmunosensores individuales.

Tabla 20. Valores seleccionados de las variables experimentales involucradas en la fabricación del magnetoinmunosensor dual de CRP y NT-proBNP.

Variable experimental	Valor seleccionado
$V_{\text{HOOC-MBs}}, \mu\text{L}$	3
$[\text{antiCRP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	50
$[\text{biotin-antiCRP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	1
$[\text{Strp-HRP}], \text{factor de dilución}$	1:1000
$t_{\text{disolución mezcla}}, \text{min}^{\text{a}}$	30
$t_{\text{incubación disolución mezcla}}, \text{min}^{\text{b}}$	45
$[\text{NT-proBNP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	5
$[\text{HRP-antiNT-proBNP}], \mu\text{g mL}^{-1}$	1

^a Tiempo de preincubación (600 rpm, 25 °C) de la disolución mezcla que contiene los dos analitos, el anticuerpo de detección correspondiente (antiNT-proBNP-HRP o el biotin-antiCRP y el conjugado de Strp-HRP), para las NT-proBNP-MBs y las antiCRP-MBs, respectivamente.

^b Tiempo de incubación de la disolución mezcla con las MBs modificadas.

Factor de dilución TMB/H₂O₂

Además de las variables presentadas en la **Tabla 20**, se optimizó el factor de dilución de la disolución comercial de TMB/H₂O₂ que se empleaba para cubrir la superficie transductora del SPdCE después de la captura magnética de las MBs modificadas y llevar a cabo la detección. En la **Figura 77** se muestran las respuestas amperométricas obtenidas con el magnetoinmunosensor dual, en ausencia y presencia de $1.0 \times 10^2 \text{ ng mL}^{-1}$ de CRP (barras de color blanco y gris, respectivamente) para las diferentes diluciones del sustrato enzimático comercial ensayadas. En la misma figura se han representado las relaciones que resultan entre los valores de intensidad de corriente obtenidos en ausencia y presencia de CRP (S/N), encontrándose la mayor relación al trabajar con la disolución comercial de TMB/H₂O₂ diluida diez veces, por lo que se seleccionó este factor de dilución para estudios posteriores. Cabe destacar además que cuando se empleaban concentraciones elevadas de sustrato enzimático y mediador redox aumentaban las señales inespecíficas (obtenidas en ausencia de CRP)

y la irreproducibilidad de las medidas, observándose asimismo una alta fotosensibilidad del TMB.

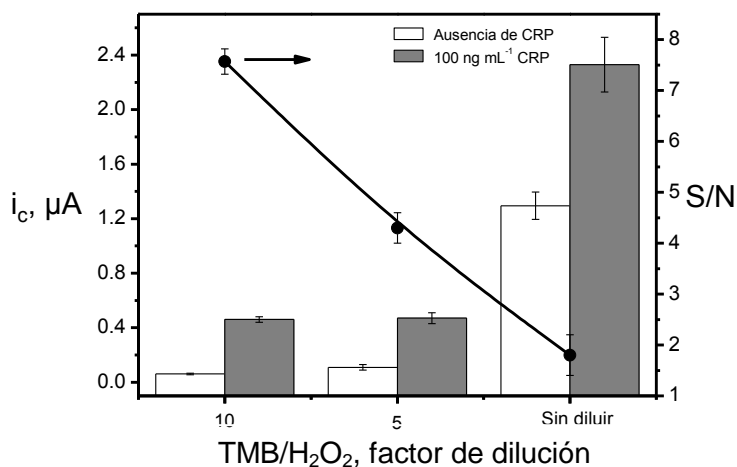


Figura 77. Influencia del factor de dilución aplicado a la disolución comercial de TMB/H₂O₂ sobre los valores de intensidad de corriente obtenidos en estado estacionario en ausencia y en presencia de 1.0×10^2 ng mL⁻¹ de CRP y sobre las correspondientes relaciones S/N. Condiciones de medida: disolución reguladora TP 0.1 M a pH 7.0; $E_{\text{app}} = -0.10$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Resto de variables experimentales mostradas en la Tabla 20. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Estudios de difusión del indicador electroactivo

Uno de los principales problemas potenciales que debe tenerse en cuenta al diseñar plataformas de multidetección electroquímica es la posible difusión del indicador electroactivo a los electrodos adyacentes, lo que daría lugar a resultados erróneos [Escamilla-Gómez, 2009]. Para evaluar la posible existencia de este problema, se planteó un estudio midiendo la respuesta obtenida en presencia y ausencia de cada uno de los marcadores considerados (Figura 78). Uno de los resultados más relevantes de este estudio fue comprobar que las respuestas amperométricas proporcionadas con el magnetoinmunosensor dual para una mezcla que contenía una elevada concentración de NT-proBNP (4.0×10^3 ng mL⁻¹) y una intermedia de CRP (1.0×10^2 ng mL⁻¹) (barras 1 de la Figura 78), eran del mismo orden que las obtenidas para las disoluciones que contenían únicamente uno de los biomarcadores (barras 2 y 3 de la Figura 78).

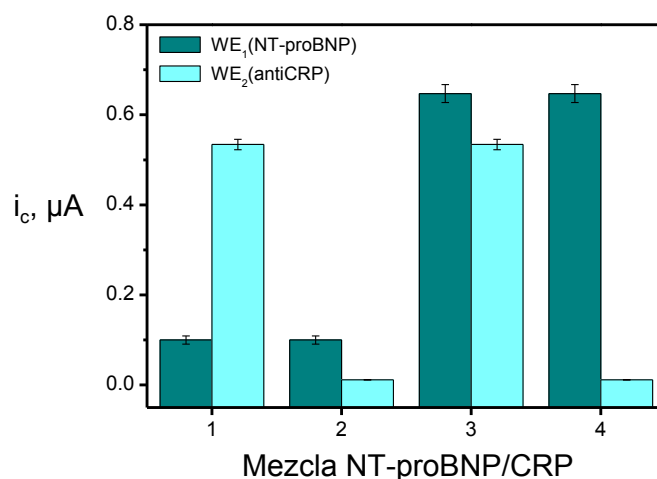


Figura 78. Valores de las intensidades de corriente en estado estacionario obtenidas simultáneamente con el magnetoinmunsensor dual para disoluciones de PBST 10 mM a pH 7.5 que contienen: 4.0×10^3 ng mL⁻¹ de NT-proBNP y 1.0×10^2 ng mL⁻¹ de CRP (1); 4.0×10^3 ng mL⁻¹ de NT-proBNP y 0 de CRP (2); 1.0×10^2 ng mL⁻¹ de CRP y 0 de NT-proBNP (3); 0 de NT-proBNP y 0 de CRP (4). Condiciones de medida: disolución reguladora TP 0.1 M a pH 7.0; $E_{app} = -0.10$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Resto de variables experimentales mostradas en la Tabla 20. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Estos resultados demostraron la ausencia de procesos de difusión significativos y la factibilidad para llevar a cabo la determinación simultánea de los dos biomarcadores en la misma muestra.

4.3.4.2. Curvas de calibrado y características analíticas

Trabajando en las condiciones experimentales optimizadas, se evaluaron las características analíticas del inmunsensor dual para cada biomarcador manteniendo constante la concentración del otro biomarcador en 1.0×10^2 ng mL⁻¹. Las curvas de calibrado obtenidas en estas condiciones para cada biomarcador se muestran en la **Figura 79**, con los hábitos lineal y sigmoidal característicos de los formatos de tipo sándwich y competitivo indirecto en los que se fundamentan las determinaciones de CRP y NT-proBNP, respectivamente.

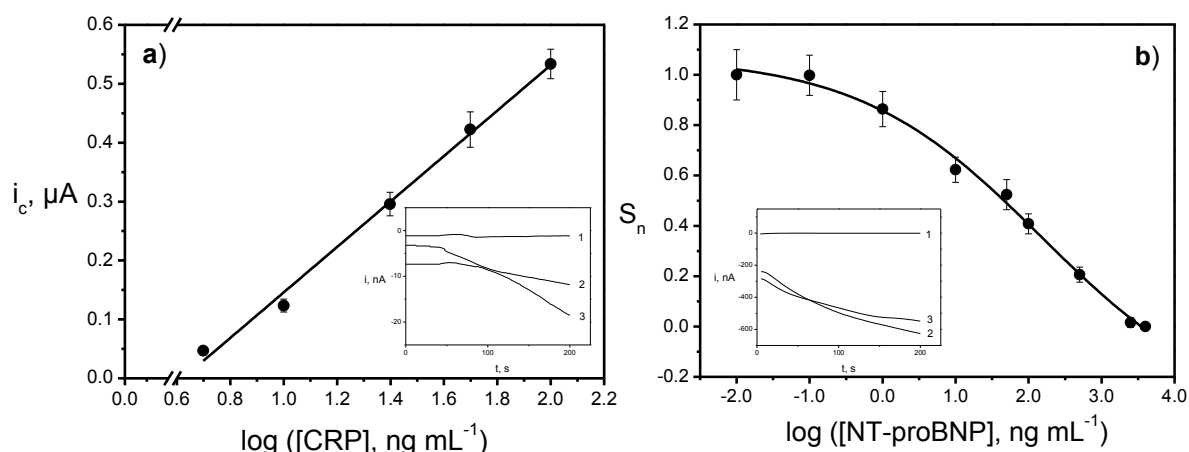


Figura 79. Curvas de calibrado obtenidas para estándares de CRP (en presencia de 1.0×10^2 ng mL $^{-1}$ de NT-proBNP) (a), y de NT-proBNP (en presencia de 1.0×10^2 ng mL $^{-1}$ de CRP) (b) preparados en PBST 10 mM a pH 7.5. $E_{app} = -0.10$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Variables experimentales mostradas en la Tabla 20. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$). Insertos: respuestas amperométricas registradas simultáneamente con el magnetoinmunosensor dual, en ausencia de marcador enzimático (1), en ausencia de ambos biomarcadores (2) y en presencia de 1 ng mL $^{-1}$ del biomarcador bajo estudio y de 1.0×10^2 ng mL $^{-1}$ del otro biomarcador (3).

Además, en las inserciones de cada gráfica se han representado las respuestas amperométricas registradas simultáneamente en ausencia de marcadores enzimáticos (1), en ausencia de analitos (2), y en presencia de 1 ng mL $^{-1}$ del biomarcador bajo estudio y de 1.0×10^2 ng mL $^{-1}$ del otro biomarcador (3), demostrándose claramente la posibilidad de detectar ambos biomarcadores a este bajo nivel de concentración.

La curva de calibrado obtenida para la determinación de CRP (**Figura 79a**) muestra un rango de linealidad entre la señal amperométrica y el logaritmo de la concentración de analito (expresada en ng mL $^{-1}$) comprendido entre 2.0 y 1.0×10^2 ng mL $^{-1}$ ($r = 0.996$), y se ajusta a la siguiente ecuación:

$$i \text{ (A)} = 3.86 \times 10^{-7} \log [\text{CRP}] \text{ (ng mL}^{-1}\text{)} - 2.40 \times 10^{-7} \quad (4)$$

En este caso, el LD y el límite de cuantificación se calculó de acuerdo con el criterio $3s_b$ y $10s_b$, respectivamente, donde s_b se estimó como la desviación estándar de las respuestas amperométricas obtenidas para 3 ng mL $^{-1}$ de CRP, expresadas en

unidades de concentración. Los valores obtenidos fueron 0.47 y 1.56 ng mL⁻¹, respectivamente.

En cuanto al NT-proBNP (**Figura 79b**), las respuestas amperométricas normalizadas (S_n), de acuerdo con la expresión (3), se representaron en función del logaritmo de la concentración de NT-proBNP (expresada en ng mL⁻¹), ajustando los datos obtenidos a la siguiente ecuación:

$$S_n = i_{\min} + (i_{\max} - i_{\min}) / (1 + 10^{(\log IC_{50} - x)h}) \quad (5)$$

donde x es la concentración de analito, i_{\max} es la asíntota máxima correspondiente a la señal en ausencia de analito, h es el valor de la pendiente de la curva en el punto de inflexión, IC_{50} es la concentración de analito en dicho punto, e i_{\min} es la asíntota mínima que corresponde a la señal en presencia de un gran exceso de analito. El intervalo lineal se definió como el intervalo de concentraciones de NT-proBNP que producía una señal entre el 80 % y el 20 % del intervalo definido por las asíntotas máxima y mínima, y, por otra parte, el LD fue calculado como la concentración de analito que producía una disminución de la señal del 10 % respecto al blanco.

Las características analíticas obtenidas para los estándares de ambos biomarcadores con el magnetoinmunosensor dual desarrollado se resumen en la **Tabla 21**.

Tabla 21. Características analíticas obtenidas con el magnetoinmunosensor dual para la determinación de ambos biomarcadores.

Parámetro	NT-proBNP	CRP
IL, ng mL ⁻¹	2.5–504.2	2–100
IC ₅₀ , ng mL ⁻¹	47.04	–
LD, ng mL ⁻¹	0.47	0.47
Pendiente, nA ng ⁻¹ mL	0.405	(3.9 ± 0.2)×10 ⁻⁷
o.o, nA	–	-(2.4 ± 0.2)×10 ⁻⁷
r	0.997	0.996
Límite de determinación, ng mL ⁻¹	–	1.56

Aunque las características analíticas obtenidas fueron peores a las que ofrecían los magnetoinmunosensores individuales, debido probablemente a la menor superficie de los electrodos de trabajo de los SPdCEs en comparación a la de los SPCEs (6.3 vs 12.6 mm²), los LDs obtenidos con el magnetoinmunosensor dual son inferiores a los puntos de corte recomendados para ambos marcadores cardiacos en muestras de suero o plasma (1000 y 1 ng mL⁻¹ para CRP y NT-proBNP, respectivamente), por lo que podría emplearse satisfactoriamente para el análisis clínico.

También se confirmó la fiabilidad de fabricación del magnetoinmunosensor dual evaluando la reproducibilidad de las respuestas amperométricas obtenidas con diez inmunosensores diferentes fabricados de la misma forma, para estándares mezcla de 25 y 50 ng mL⁻¹ de CRP y NT-proBNP, respectivamente, obteniéndose unos valores de RSD del 6.3 y 9.4 %, respectivamente.

4.3.4.3. Aplicación al análisis simultáneo del péptido natriurético cerebral N-terminal y de la proteína C reactiva en un material de referencia

Con el fin de demostrar la utilidad de la metodología desarrollada para la detección simultánea de ambos biomarcadores, el magnetoinmunosensor dual se

aplicó al análisis de un material de referencia con un contenido certificado de CRP ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), contaminado con NT-proBNP (1 ng mL^{-1}), siguiendo el protocolo descrito en el Apdo. 3.3.6.6.

Puesto que en el trabajo con el inmunosensor para la determinación individual de CRP se comprobó que no existía un efecto matriz significativo al diluir diez veces la muestra de suero, se quiso comprobar si existía efecto matriz trabajando en estas condiciones en el caso del NT-proBNP. Para ello, se construyó un calibrado de NT-proBNP en el material de referencia de CRP diluido diez veces en PBST a pH 7.5, y contaminado con concentraciones crecientes de NT-proBNP (de 0 a $4.0 \times 10^3 \text{ ng mL}^{-1}$). Como puede observarse en la **Figura 80**, en estas condiciones era posible llevar a cabo la determinación de NT-proBNP con buenas características analíticas (IL comprendido entre 0.53 y 193 ng mL^{-1} , IC_{50} de 11.73 y LD de 0.09 ng mL^{-1}). El hecho de obtener un LD 5 veces inferior en muestras de suero que en disoluciones estándares (0.47 vs 0.09 ng mL^{-1}) puede atribuirse nuevamente a una minimización de las adsorciones inespecíficas que ocurren sobre las HOOC-MBs por parte de alguno de los componentes de la matriz biológica.

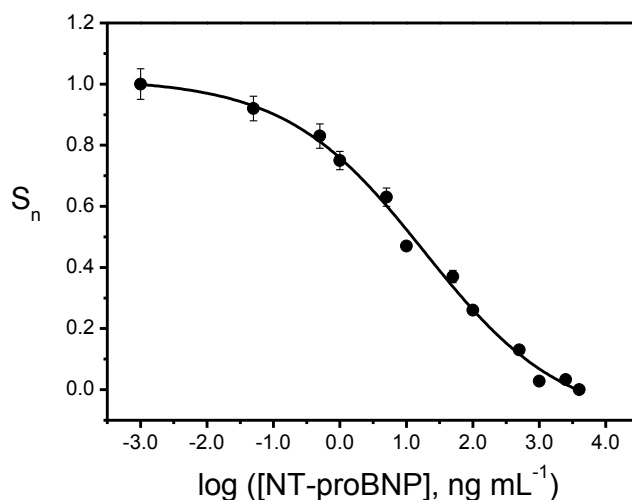


Figura 80. Curva de calibrado obtenida para NT-proBNP en un material de referencia con un contenido certificado de CRP diluido 10 veces en PBST 10 mM a pH 7.5 y contaminado con concentraciones crecientes de NT-proBNP. $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Variables experimentales descritas en la Tabla 20. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Teniendo en cuenta estos resultados, la determinación de CRP y NT-proBNP en las muestras se realizó mediante interpolación de las respuestas amperométricas obtenidas para las mismas, en el calibrado de CRP obtenido con disoluciones estándares (**Figura 79a**) y en el calibrado de NT-proBNP obtenido en el material de referencia diluido 10 veces (**Figura 80**), respectivamente.

En el análisis de seis réplicas se obtuvo un contenido medio de $(1.02 \pm 0.04) \mu\text{g mL}^{-1}$ de CRP y de $(1.0 \pm 0.1) \text{ ng mL}^{-1}$ de NT-proBNP ($\alpha = 0.05$), demostrándose la posibilidad de determinar simultáneamente ambos biomarcadores en muestras reales, con una simple dilución de las mismas, y en un tiempo total aproximado de 60 min una vez que las antiCRP-MBs y las NT-proBNP-MBs estaban preparadas.

Cabe destacar también que, a pesar de la gran diferencia de concentración existente entre los dos biomarcadores en la muestra clínica, el magnetoinmunoensayo dual desarrollado permite su determinación en un único ensayo sin necesidad de separarlos o de utilizar una dilución distinta de la muestra para cada cuantificación.

4.3.5. INMUNOSENSOR INTEGRADO PARA LA DETERMINACIÓN DE LIPOPROTEÍNA-A

Uno de los aspectos más importantes en el diseño de inmunosensores electroquímicos de superficie es la elección del método de inmovilización de las biomoléculas, que debe asegurar que éstas mantengan su actividad biológica. Entre la gran variedad de estrategias descritas en la bibliografía, la unión covalente de las biomoléculas a superficies activadas químicamente resulta una alternativa interesante a los métodos físicos para mejorar la sensibilidad y estabilidad de los inmunosensores electroquímicos [Hayat, 2011], [Huy, 2011].

Así, para la determinación de la Lp(a), se ha desarrollado un inmunosensor amperométrico integrado basado en un formato tipo sándwich y en el empleo de SPCEs modificados con una capa densa de HS-NTA. Para ello, se ha aprovechado la fuerte adsorción de las largas cadenas alquílicas del compuesto empleado sobre la superficie de carbono [Conzuelo, 2013]. Además, cada molécula adsorbida de HS-NTA presenta tres grupos $-COOH$ terminales susceptibles de inmovilizar el anticuerpo de captura (antiLp(a)) tras su activación con el sistema EDC/sulfo-NHS (Figura 80).

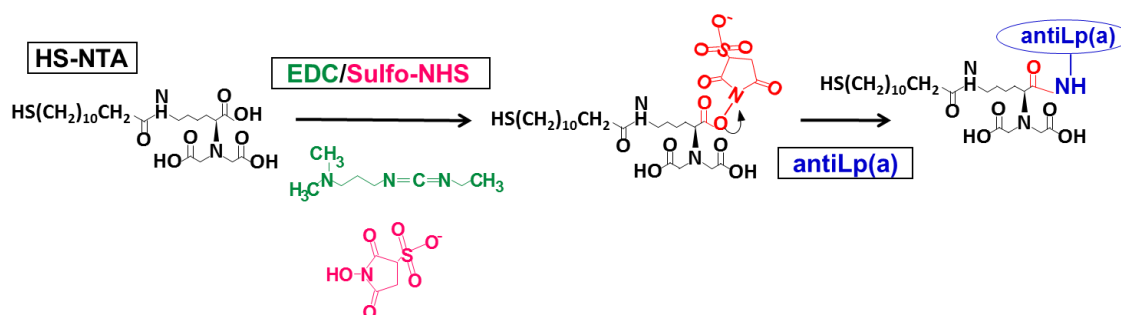


Figura 80. Diagrama esquemático de la adsorción de las cadenas de HS-NTA sobre la superficie de los SPCEs, de la posterior activación de sus grupos $-COOH$ terminales mediante el sistema EDC/sulfo-NHS y de la inmovilización covalente del antiLp(a) (para simplificar el esquema solamente se muestra la activación de uno de los tres grupos $-COOH$).

A continuación, tras una etapa de bloqueo con una disolución de leche semidesnatada diluida a la mitad en PBS 10 mM a pH 7.5, se realizaba la incubación con una disolución mezcla que contenía una concentración variable de Lp(a) y

concentraciones fijas del anticuerpo de detección biotinilado (biotin-antiLp(a)) y del conjugado de Strp-HRP, y que se había preparado 30 min antes. Para la medida, se depositaban 45 μL de TP a pH 7.0 sobre el SPCE modificado y se iniciaba la amperometría (-0.1 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag). Alcanzado el estado estacionario, se adicionaban 5 μL de la disolución comercial de TMB/ H_2O_2 , registrándose la intensidad de reducción transcurridos 200 s de la adición del sustrato.

4.3.5.1. Optimización de variables experimentales

Se han optimizado todas las variables experimentales involucradas en la fabricación del inmunosensor, tomando como criterio de selección la relación entre la intensidad de señal obtenida en presencia de $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (i_1) y en ausencia (i_0) de Lp(a). Se eligió un nivel de concentración de $1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ya que era un valor con el que se obtenía una señal significativamente diferente del blanco. En la **Tabla 22** se resumen los intervalos de estudio y los valores seleccionados de todas las variables experimentales optimizadas.

Tabla 22. Optimización de variables experimentales implicadas en la preparación del inmunosensor electroquímico integrado para la determinación de Lp(a).

Variable experimental	Intervalo de estudio	Valor seleccionado
Número de etapas	1–3	1
[HS-NTA], mM	0.5–2.0	1.5
$t_{\text{HS-NTA}}$, min	30–240	120
[antiLp(a)], $\mu\text{g mL}^{-1}$	50–500	200
$t_{\text{antiLp(a)}}$, min	30–120	60
[Leche], factor de dilución	1/10–Sin diluir	1:2
t_{bloqueo} , min	15–60	30
[biotin-antiLp(a)], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.5–4.0	2.0
[Strp-HRP], factor de dilución	1:500–1:5000	1:1000
$t_{\text{preinc mezcla}}$, min ^a	0–60	30
$t_{\text{inc mezcla}}$, min ^b	15–60	15

^aTiempo de preincubación de la disolución mezcla que contiene Lp(a), biotin-antiLp(a) y Strp-HRP.

^bTiempo de incubación de la disolución mezcla sobre la superficie del electrodo de trabajo.

Número de etapas de incubación

Inicialmente se estudió la influencia del número de etapas implicadas en la construcción del inmunoensayo tipo sándwich sobre las relaciones i_1/i_0 obtenidas: i) una sola etapa de incubación de 30 min con una disolución mezcla de Lp(a), biotin-antiLp(a) y Strp-HRP, ii) dos etapas de incubación de 30 min cada una, una primera con Lp(a) y, a continuación, una segunda etapa con una disolución mezcla biotin-antiLp(a) y Strp-HRP y iii) tres incubaciones consecutivas de 30 min con disoluciones individuales de Lp(a), biotin-antiLp(a) y Strp-HRP. Como puede observarse en la **Figura 81**, la mayor relación i_1/i_0 se obtuvo al realizar una única etapa de incubación de 30 min con la disolución mezcla del analito, el anticuerpo de detección y el marcador enzimático, lo que se atribuyó a una mayor eficiencia de las reacciones inmunológicas y de marcaje como consecuencia de un menor impedimento estérico cuando los tres componentes

se encuentran en una disolución homogénea. Consecuentemente se continuó trabajando en estas condiciones, lo que además se traducía en un menor tiempo de análisis.

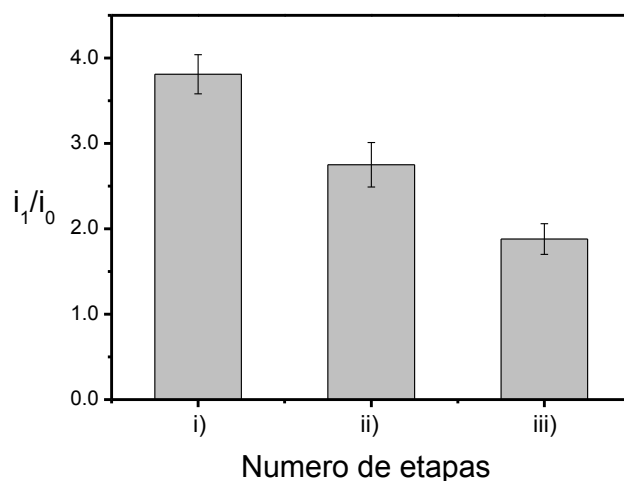


Figura 81. Efecto del número de etapas de incubación sobre la relación i_1/i_0 obtenida para estándares de 1.0 y 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; [HS-NTA] = 1.5 mM ; $t_{\text{HS-NTA}}$ = 120 min; [biotin-antiLp(a)] = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $t_{\text{antiLp(a)}}$ = 60 min; Factor de dilución de Strp-HRP = 1:1000; Factor de dilución de la leche = 1:2; V_{inc} = 10 μL ; t_{preinc} = 30 min; t_{inc} = 45 min; E_{app} = -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a 3 \times s (n = 3).

Concentración de HS-NTA y tiempo de deposición de la capa de HS-NTA

A continuación se optimizó la concentración y el tiempo de adsorción de la capa de HS-NTA sobre la superficie del electrodo de trabajo de carbono. En la **Figura 82a** se puede observar, como aumentaba la relación i_1/i_0 hasta una concentración de 1.5 mM de NTA, descendiendo bruscamente para concentraciones superiores, lo que podía atribuirse a un impedimento de la transferencia electrónica para elevadas concentraciones de compuesto o a que una gran cantidad de antiLp(a) inmovilizado conlleva un peor reconocimiento del antígeno por impedimento estérico. Por ello, se escogió una concentración 1.5 mM de HS-NTA para la modificación de la superficie electródica. Por otro lado, se estudió la influencia del tiempo de deposición de la capa, observándose la mayor relación i_1/i_0 para 2 h, tiempo seleccionado como óptimo (**Figura 82b**).

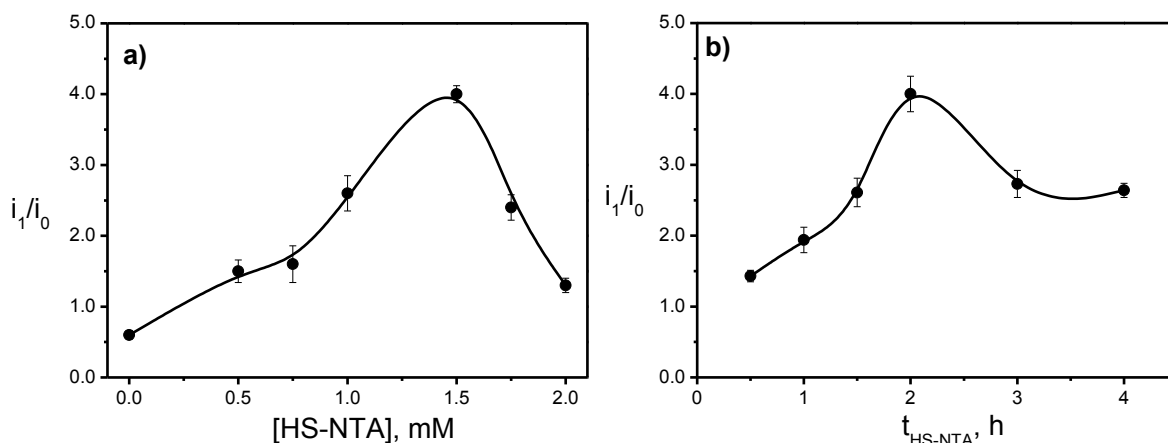


Figura 82. Efecto de la concentración (a) y del tiempo de deposición (b) de la disolución de HS-NTA sobre la relación i_1/i_0 obtenida para estándares de 1.0 y 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; $[HS-NTA] = 1.5 \text{ mM}$ (b); $t_{HS-NTA} = 120 \text{ min}$ (a); $[\text{biotin-antiLp(a)}] = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $t_{\text{antiLp(a)}} = 60 \text{ min}$; Factor de dilución de Strp-HRP = 1:1000; Factor de dilución de la leche = 1:2; $t_{\text{preinc}} = 30 \text{ min}$; $t_{\text{inc}} = 45 \text{ min}$; $V_{\text{inc}} = 10 \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Concentración y tiempo de inmovilización de antiLp(a)

Cuando el elemento de reconocimiento se inmoviliza directamente sobre la superficie del electrodo, la etapa de inmovilización no sólo afecta a la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, sino que también influye sobre la propia capacidad sensora de la superficie. Por esta razón, con el fin de obtener un comportamiento electroquímico óptimo, es esencial que la superficie del electrodo no esté pasivada por el elemento de reconocimiento inmovilizado sobre ella [Ricci, 2012]. Con este fin se optimizó tanto la concentración como el tiempo de inmovilización del anticuerpo de captura. Como era de esperar, la relación i_1/i_0 aumentó con la concentración de antiLp(a), hasta un valor de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, y disminuyó para concentraciones superiores (Figura 83a).

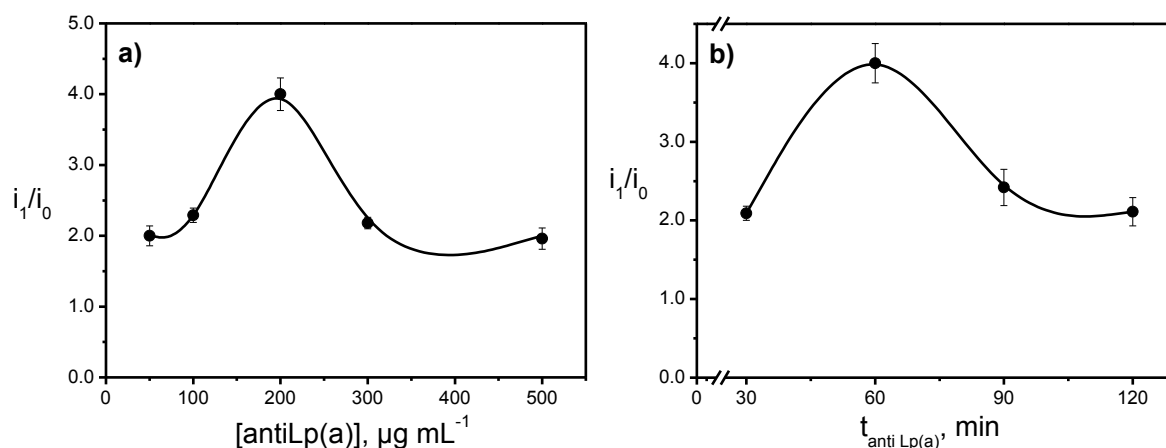


Figura 83. Efecto de la concentración (a) y del tiempo de incubación (b) de la disolución de antiLp(a) sobre la relación i_1/i_0 obtenida a partir de las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de 1.0 y 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; [HS-NTA] = 1.5 mM; $t_{\text{HS-NTA}}$ = 120 min; [antiLp(a)] = 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b); $t_{\text{antiLp(a)}}$ = 60 min (a); [biotin-antiLp(a)] = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Factor de dilución de Strp-HRP = 1:1000; Factor de dilución de la leche = 1:2; t_{preinc} = 30 min; t_{inc} = 45 min; V_{inc} = 10 μL ; E_{app} = -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ (n = 3).

En el caso de sensores integrados, la disminución observada en presencia de altas concentraciones de anticuerpo inmovilizado puede atribuirse, como se ha comentado anteriormente, a un peor reconocimiento del antígeno por problemas de impedimento estérico o al aumento en la resistencia a la transferencia electrónica. En cuanto al tiempo de inmovilización del anticuerpo de captura sobre la superficie del electrodo, se encontró la relación i_1/i_0 óptima para un tiempo de incubación de 60 min (**Figura 83b**). Para tiempos superiores la mayor cantidad de anticuerpo inmovilizada se traducía en un peor funcionamiento del inmunosensor integrado.

Factor de dilución del agente bloqueante (leche) y tiempo de bloqueo

La presencia de caseínas en la leche se aprovechó para emplearla como agente de bloqueo de los grupos residuales activados de la superficie modificada del electrodo, y así minimizar adsorciones inespecíficas posteriores. Así, se optimizó tanto el factor de dilución como el tiempo de bloqueo con la leche semidesnatada empleada. Los resultados obtenidos (**Figura 84**), demostraron que tanto el factor de dilución 1/2, como el tiempo de bloqueo de 30 min que se estaban aplicando desde el comienzo del

desarrollo del inmunosensor, eran los más adecuados para seguir trabajando, ya que estas condiciones proporcionaban las mayores relaciones i_1/i_0 entre los valores de intensidad obtenidos en presencia y ausencia de Lp(a).

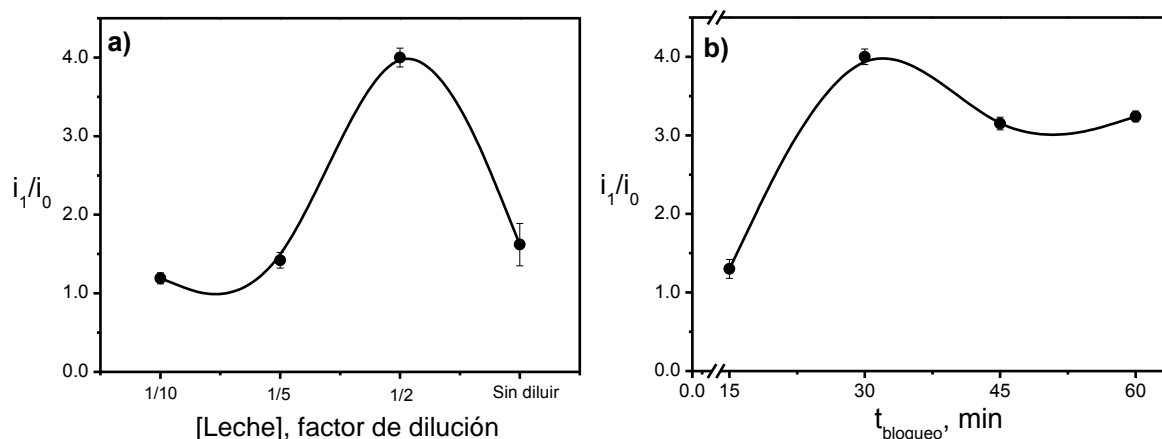


Figura 84. Efecto de la concentración (a) y del tiempo de incubación (b) de la disolución de leche empleada en la etapa de bloqueo sobre los valores de la relación i_1/i_0 obtenida para estándares de 1.0 y 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; [HS-NTA] = 1.5 mM; $t_{\text{HS-NTA}}$ = 120 min; [antiLp(a)] = 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $t_{\text{antiLp(a)}}$ = 60 min; [biotin-antiLp(a)] = 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Factor de dilución de Strp-HRP = 1:1000; Factor de dilución de la leche = 1/2 (b); t_{preinc} = 30 min; t_{inc} = 45 min; V_{inc} = 10 μL ; E_{app} = -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Concentración del biotin-antiLp(a) y factor de dilución del conjugado de Strp-HRP

La optimización de la concentración del anticuerpo de detección se llevó a cabo estudiando su efecto en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.5 y 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. La mejor relación i_1/i_0 se obtuvo para 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, observándose una disminución de tal relación para concentraciones superiores (**Figura 85a**), por lo que se continuó trabajando con 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de biotin-antiLp(a).

Por otra parte, se estudió el efecto de emplear diferentes factores de dilución del conjugado de Strp-HRP comercial reconstituido (que contenía 500 U mL^{-1}), encontrándose el valor óptimo empleando un factor de dilución de 1:1000 (**Figura 85b**), que coincidía con la dilución recomendada por la casa comercial.

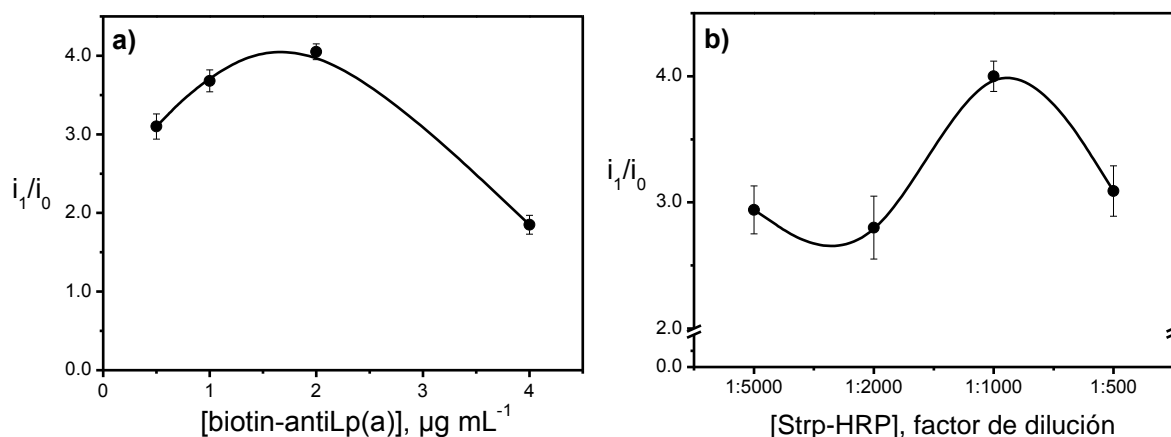


Figura 85. Efecto de la concentración de biotin-antiLp(a) (a) y del factor de dilución del conjugado de Strp-HRP (b) sobre los valores de la relación i_1/i_0 obtenida para estándares de 1.0 y 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M apH 7.0; [HS-NTA] = 1.5 mM; $t_{\text{HS-NTA}}$ = 120 min; [antiLp(a)] = 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $t_{\text{antiLp(a)}}$ = 60 min; [biotin-antiLp(a)] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b); Factor de dilución de Strp-HRP = 1:1000 (a); Factor de dilución de la leche = 1/2; t_{preinc} = 30 min; t_{inc} = 45 min; V_{inc} = 10 μL ; E_{app} = -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a 3 \times s (n = 3).

Tiempo de preincubación y de incubación de la mezcla

Con objeto de obtener el inmunosensor con las mejores características analíticas, el tiempo durante el que se dejaba reaccionar la disolución mezcla que contenía el antígeno, el anticuerpo de detección biotinilado y el marcador enzimático, así como el tiempo de incubación de esta mezcla sobre la superficie previamente modificada, del electrodo de trabajo, también fueron optimizados. Como se muestra en la **Figura 86a**, el tiempo previo de incubación de la mezcla que se había empleado hasta el momento para la fabricación del inmunosensor (30 min) resultó ser el que otorgaba una relación i_1/i_0 más favorable, por lo que se mantuvo para estudios posteriores. Sin embargo, en el estudio del tiempo de incubación de la mezcla sobre el electrodo modificado con el anticuerpo de captura, se obtuvo la mayor relación i_1/i_0 entre 15 y 30 min (**Figura 86b**), observándose un acusado descenso de la relación para tiempos superiores, lo que probablemente se debía a fenómenos de agregación de la proteína. En vista de estos resultados, se seleccionó un tiempo de incubación sobre la superficie electródica de 15 min.

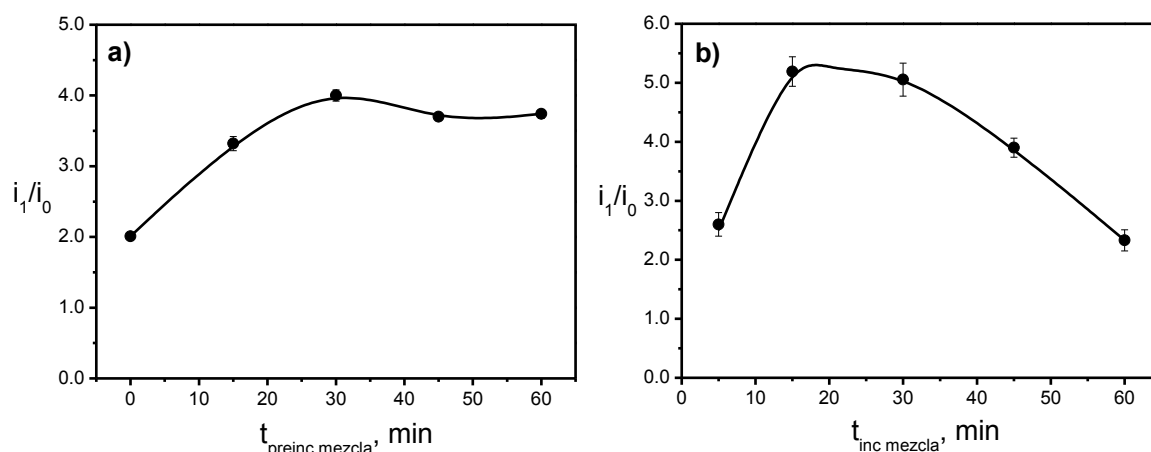


Figura 86. Efecto de los tiempos de preincubación (a) y de incubación sobre el electrodo (b) de la disolución mezcla de Lp(a), biotin-antiLp(a) y Strp-HRP sobre los valores de la relación i_1/i_0 obtenida para estándares de 1.0 y 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a). Condiciones experimentales: disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0; [HS-NTA] = 1.5 mM; $t_{\text{HS-NTA}}$ = 120 min; [antiLp(a)] = 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$; $t_{\text{antiLp(a)}}$ = 60 min; [biotin-antiLp(a)] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Factor de dilución de Strp-HRP = 1:1000; Factor de dilución de la leche = 1/2; t_{preinc} = 30 min (b); t_{inc} = 45 min (a); V_{inc} = 10 μL ; E_{app} = -0.10 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Es importante mencionar que no se obtenía señal amperométrica significativa para disoluciones estándar de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a) cuando se fabricaba el inmunosensor integrado en ausencia de HS-NTA, o cuando se omitía la etapa de activación de la superficie modificada con HS-NTA de los SPCEs con el sistema EDC/sulfo-NHS, lo que demuestra el papel esencial del HS-NTA y de la activación posterior de sus grupos -COOH terminales en la inmovilización covalente del anticuerpo de captura y el desarrollo del inmunosensor.

4.3.5.2. Características analíticas y estabilidad

La curva de calibrado obtenida en las condiciones optimizadas para estándares de Lp(a) preparados en PBST 10 mM a pH 7.5 (**Figura 87**) presentó una relación lineal entre la respuesta amperométrica y el logaritmo de la concentración de Lp(a) entre 0.02 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r = 0.990$), con una pendiente de $(2.5 \pm 0.1) \times 10^{-8}$ A, y una ordenada en el origen de $(6.2 \pm 0.2) \times 10^{-8}$ A.

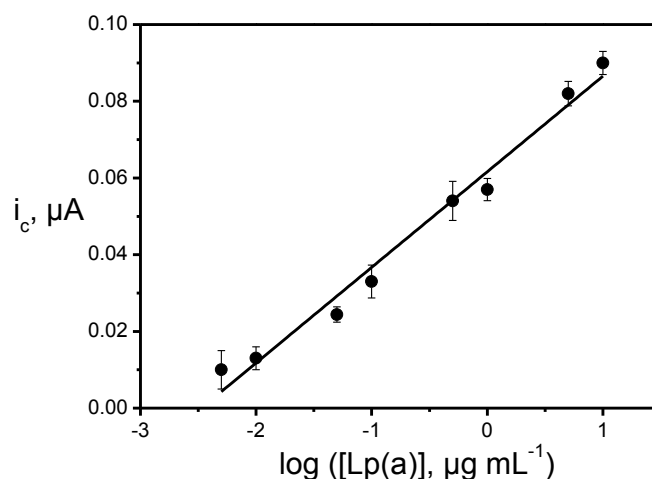


Figura 87. Curva de calibrado obtenida en las condiciones optimizadas para estándares de Lp(a) preparados en PBST 10 mM a pH 7.5. $E_{app} = -0.10$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Resto de variables experimentales mostradas en la Tabla 22. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

Con la metodología descrita, se obtuvieron LDs y límites de determinación muy bajos, de 0.008 y $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, calculados de acuerdo a los criterios $3s_b$ y $10s_b$ (ambos expresados en unidades de concentración), siendo s_b la desviación estándar ($n = 10$) de los valores de concentración obtenidos mediante la interpolación de las intensidades de corriente registradas en ausencia de Lp(a) en el calibrado obtenido para los estándares. Es importante destacar, que el LD alcanzado fue 25000 veces inferior al punto de corte recomendado en muestras de suero para predecir un mayor riesgo cardiovascular, establecido en 20 mg dL^{-1} , y además, muy inferior a los LDs alcanzados con otros métodos de análisis tradicionales (desde 0.3 mg dL^{-1} con inmunoensayos turbidimétricos a 5 mg dL^{-1} con métodos ELISA).

Esta elevada sensibilidad obtenida, en concordancia con el bajo valor de la constante de disociación estimado mediante ELISA ($K_d = 0.066 \text{ nM}$), confirmaba la elevada afinidad entre el antígeno y el anticuerpo de detección [Huang, 2008^b].

Se evaluó la reproducibilidad entre las respuestas amperométricas obtenidas para estándares de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a) con diez inmunosensores diferentes preparados de la misma manera. En estas condiciones se obtuvo una RSD del 6.8 %, demostrando

la fiabilidad del proceso de modificación de los SPCEs y de obtención de la respuesta amperométrica.

También se estudió la estabilidad con el tiempo del inmunosensor integrado de Lp(a), para lo que se prepararon diferentes SPCEs modificados con el antiLp(a), que se secaron bajo corriente de nitrógeno y se almacenaron a 4 °C en una atmósfera húmeda hasta su uso. Para ello se construyó un gráfico de control tomando como punto de referencia el valor medio de 10 medidas obtenidas para estándares de Lp(a) de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ el primer día de estudio, y fijando los límites de control en $\pm 3s$ de este valor de referencia. Como puede observarse (**Figura 88**), la media de las tres medidas realizadas cada día de control se encontraba dentro de dichos límites durante 7 días, observándose una disminución de la intensidad de corriente a partir de ese momento. Estos datos estaban de acuerdo con la estabilidad descrita en la bibliografía para otros sensores integrados basados en la inmovilización de proteínas modificadas con un tag de histidinas sobre SPCEs modificados con HS-NTA y Co^{2+} [Conzuelo, 2013]. Estos resultados demuestran la posibilidad de preparar con antelación los antiLp(a)-SPCEs y realizar la determinación de Lp(a) en un tiempo total de tan sólo 45 min.

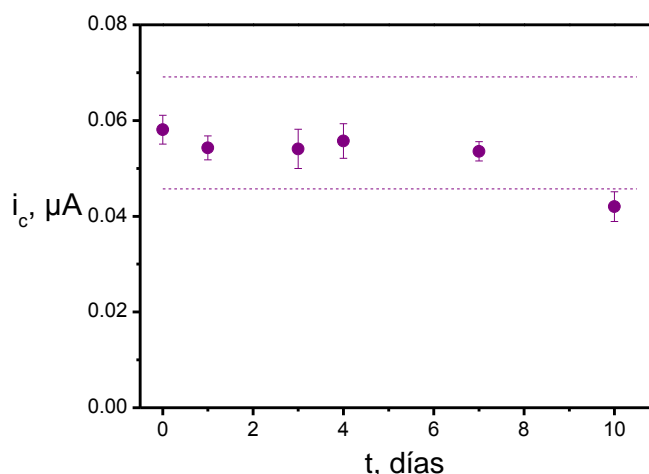


Figura 87. Gráfico de control construido para evaluar la estabilidad de los antiLp(a)-SPCEs almacenados a 4 °C. Resultados de las intensidades de corriente obtenidas para estándares de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a). Disolución reguladora de medida TP 0.1 M a pH 7.0, $E_{\text{app}} = -0.10$ V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag. Resto de condiciones experimentales mostradas en la Tabla 22. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

4.3.5.3. Estudio de interferencias

Para evaluar la selectividad del inmunosensor se compararon las respuestas amperométricas obtenidas en presencia de elevadas concentraciones de los siguientes marcadores cardíacos: CRP (500 ng mL^{-1}), NT-proBNP (7.5 ng mL^{-1}) y cTnT (500 ng mL^{-1}); de otras proteínas normalmente presentes en muestras de suero y plasma humanos: BSA (5 mg mL^{-1}), dímero-D ($0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) e IgG (0.4 mg mL^{-1}); y de hemoglobina (5 mg mL^{-1}) y bilirrubina ($20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$). El estudio se realizó mediante la comparación de las señales amperométricas obtenidas para estándares de $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a) preparados en ausencia y presencia de todas estas sustancias seleccionadas como posibles interferentes. En la **Figura 89** queda claramente demostrado que ninguna de las sustancias ensayadas representaba una interferencia significativa en la determinación de Lp(a) con el inmunosensor integrado descrito, confirmándose la gran selectividad de la estrategia implementada para la determinación de Lp(a) en muestras complejas en las que están presentes otros biomarcadores cardíacos y otras proteínas en concentraciones elevadas.

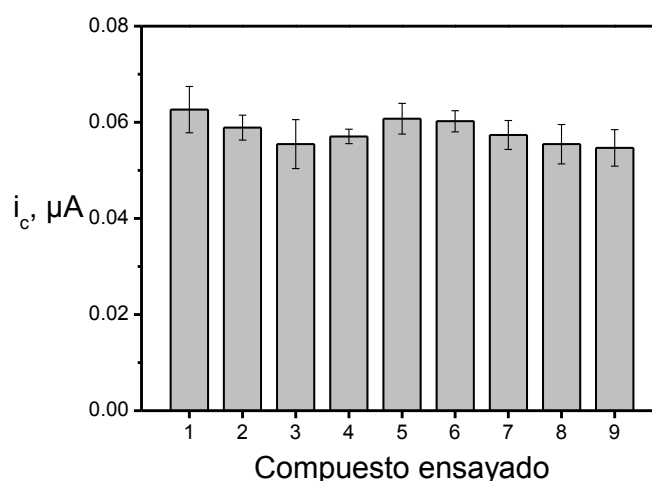


Figura 89. Selectividad del inmunosensor integrado para Lp(a). Intensidades de corriente medidas para estándares de $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a) preparados en ausencia (1) y en presencia de 5 mg mL^{-1} de BSA (2), 500 ng mL^{-1} de CRP (3), 7.5 ng mL^{-1} de NT-proBNP (4), 500 ng mL^{-1} de cTnT (5), 5 mg mL^{-1} de hemoglobina (6), $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de bilirrubina (7), $0.5 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ de dímero-D (8) y 0.4 mg mL^{-1} de IgG humana (9). Condiciones experimentales mostradas en la Tabla 22. Barras de error correspondientes a $3 \times s$ ($n = 3$).

4.3.5.4. Aplicación al análisis de muestras de suero humano

Teniendo en cuenta los prometedores resultados obtenidos con el inmunosensor integrado de Lp(a), se decidió aplicarlo al análisis de muestras reales para evaluar su posible implementación como herramienta de diagnóstico clínico. Para ello, se seleccionaron muestras de suero contaminadas con $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a) (valor de corte establecido para pacientes con enfermedad de las arterias coronarias) y un suero comercial con un contenido de Lp(a) certificado.

Para el análisis de las muestras de suero contaminadas, en primer lugar y con el fin de evaluar el posible efecto matriz debido a los componentes endógenos del suero, disoluciones de suero diluido 40 veces con PBST a pH 7.5 se inocularon con concentraciones crecientes de Lp(a). La comparación estadística de los valores de la pendiente obtenida para este calibrado ($(2.50 \pm 0.07) \times 10^{-8} \text{ A}$), ($r = 0.996$), y la que resulta con estándares ($(2.49 \pm 0.14) \times 10^{-8} \text{ A}$), demostró que no existía un efecto matriz significativo tras aplicar esta dilución a la muestra, ya que el valor de la t_{calc} era inferior (0.433) al de la t_{tab} (2.179).

Atendiendo a esto, se determinó la concentración de Lp(a) en muestras de suero contaminadas con $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a) y diluidas 40 veces, mediante interpolación de la intensidad de corriente obtenida para cada muestra en el calibrado realizado para los estándares de Lp(a) (**Figura 87**). El análisis de cinco muestras diferentes, proporcionó un contenido medio de Lp(a) de $(200 \pm 7) \mu\text{g mL}^{-1}$ ($\alpha = 0.05$) y un porcentaje de recuperación del $(100 \pm 3) \%$, resultados que ponen de manifiesto la validez del inmunosensor desarrollado para la determinación de este marcador cardiaco en muestras clínicas al nivel de relevancia.

La validez del método también fue demostrada mediante la determinación de la concentración de Lp(a) en una muestra de suero comercial con un contenido certificado de Lp(a) de 56.1 mg dL^{-1} , y diluido 100 veces con PBST 0.01 M a pH 7.5. Una vez más se comprobó la ausencia de efecto matriz realizando un calibrado del suero diluido hasta un contenido final de $0.561 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Lp(a), y sobre el que se añadieron

concentraciones crecientes de biomarcador. El valor de la pendiente obtenido para este calibrado ($(2.66 \pm 0.12) \times 10^{-8}$ A), ($r = 0.996$) no fue estadísticamente diferente al valor de la pendiente obtenida con estándares ($t_{\text{calc}} = 0.169$; $t_{\text{tab}} = 2.306$), con lo que se demostraba la ausencia de un efecto matriz significativo tras diluir la muestra 100 veces. Consecuentemente, la determinación de la concentración de Lp(a) se realizó interpolando el valor de intensidad de corriente obtenido para cada muestra diluida, en el calibrado obtenido con estándares. Los resultados obtenidos del análisis de siete réplicas de la muestra dieron un contenido medio de Lp(a) de $(560 \pm 9) \mu\text{g mL}^{-1}$ y la comparación estadística de acuerdo al test de la t de Student ($t_{\text{calc}} = 0.326$; $t_{\text{tab}} = 2.447$), permitió concluir que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante el empleo del inmunosensor integrado de Lp(a) y la concentración de Lp(a) reflejada en el producto comercial ($\alpha = 0.05$).

Es importante destacar que, hasta ahora, en la bibliografía no aparece descrito ningún inmunosensor de Lp(a) (electroquímico o no). Los ensayos actualmente disponibles para la determinación de este biomarcador presentan una sensibilidad menor que el desarrollado en este trabajo, son laboriosos, requieren largos tiempos de análisis, procesos multietapa y sistemas de detección caros. El corto tiempo de análisis requerido con el inmunosensor desarrollado (tan sólo 45 min), sus buenas características analíticas y el empleo de electrodos desechables fabricados en masa, junto con la sencillez y facilidad de automatización y miniaturización de la instrumentación utilizada hacen del inmunosensor integrado desarrollado una prometedora alternativa como herramienta de diagnóstico y pronóstico en análisis clínicos. Por otro lado, cabe prever que el sencillo, versátil, eficiente y rápido procedimiento de inmovilización desarrollado se podrá emplear en el desarrollo de otras estrategias bioanalíticas de interés.

4.4. GENOSENSORES DE SUPERFICIE. FACTORES DETERMINANTES DEL LÍMITE DE DETECCIÓN Y DE LA ESPECIFICIDAD

En los últimos años, los sensores basados en la inmovilización de diferentes biomoléculas sobre la superficie electródica, entre los que se encuentran los genosensores, han adquirido mucho interés, debido a las posibilidades que ofrecen para el diseño de diferentes dispositivos de diagnóstico descentralizado.

Centrando el tema en los genosensores electroquímicos, un aspecto clave en su desarrollo es la inmovilización eficiente de las sondas de oligonucleótidos sobre los soportes electródicos. En este trabajo, como se ha explicado en detalle en el Apdo.3.3.5 de la Parte Experimental, se ha propuesto un modelo de sensor electroquímico de DNA, empleando electrodos serigrafiados con pasta de oro, para demostrar la influencia de las variables implicadas en la fabricación del genosensor sobre el límite de detección y la especificidad.

Brevemente, el genosensor desarrollado se ha basado en el empleo de una sonda de captura de 27 bases modificada covalentemente en su extremo 3' con azul de metileno (MB) y en su extremo 5' con un grupo tiol que permitía su inmovilización covalente a la superficie de oro de los SPAuEs utilizados, mediante la formación de la correspondiente monocapa autoensamblada. A continuación, se realizaba una incubación con una disolución de mercaptohexanol (C6-OH), empleado como agente espaciador capaz de reorientar verticalmente las moléculas de DNA enlazadas covalentemente, desplazar las que hubiesen quedado fisisorbidas y rellenar los huecos libres de monocapa, evitando posibles adsorciones inespecíficas de las secuencias diana o del indicador redox sobre la superficie electródica no modificada y asegurar la máxima eficiencia en la hibridación. Para realizar la detección electroquímica del proceso de hibridación con las secuencias diana, los electrodos modificados con la sonda de captura y el C6-OH se conservaron durante 30 min en la disolución reguladora de medida y, seguidamente, se registraron las medidas por SWV (realizando barridos entre -0.40 y -0.05 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag a 25 mV y con una frecuencia de 50 Hz) cada 5 min, hasta que la corriente de pico se

estabilizaba. Posteriormente, cada SPAuE modificado se incubó con las correspondientes disoluciones de DNA diana y, transcurrido el tiempo de hibridación, se registraban las medidas electroquímicas correspondientes.

El fundamento de medida se ha basado en la diferencia entre la señal voltamperométrica obtenida para el MB (empleado como indicador electroquímico) en presencia de la hebra simple y después de producirse la hibridación. Como puede observarse en la **Figura 90** al producirse la hibridación entre la sonda de captura y el DNA diana, el indicador redox se alejaba de la superficie del electrodo, dificultándose la transferencia electrónica y disminuyendo la intensidad del pico correspondiente a su oxidación. De esta forma, la relación entre el valor de la intensidad de pico obtenida en ausencia y presencia de DNA diana permitía obtener el % de supresión de señal (que se normalizó respecto a una escala de 0 a 100 para una interpretación más sencilla de los resultados). Una ventaja de emplear el MB como indicador redox es que su potencial de oxidación es relativamente bajo (~ -0.20 V vs el electrodo de pseudoreferencia de Ag), lo que permite minimizar las posibles interferencias electroactivas y asegurar la estabilidad del sustrato electródico de oro durante la medida electroquímica.

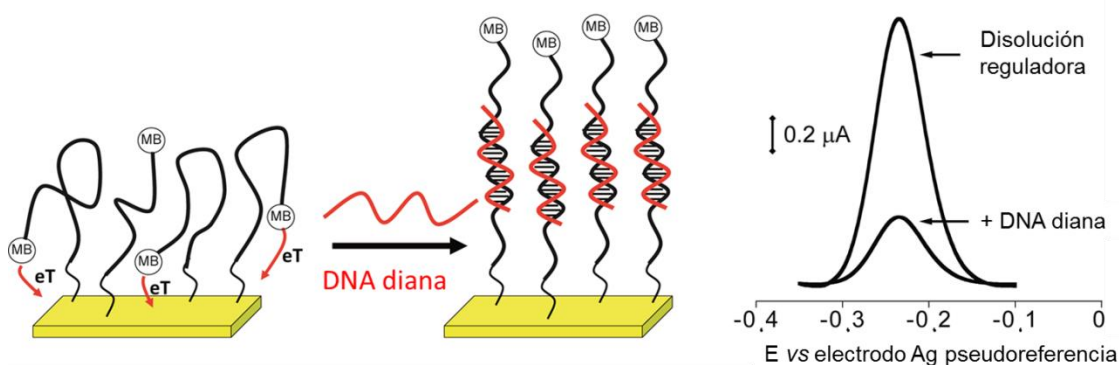


Figura 90. Representación esquemática del modelo de sensor electroquímico de DNA, con los picos de corriente faradaica correspondientes a la oxidación electroquímica del MB terminal de la sonda de captura obtenidos antes y después del proceso de hibridación con la secuencia diana.

Para la realización de este trabajo se ha supuesto que los genosensores basados en la inmovilización de DNA sobre la superficie de los SPAuEs descritos

pueden operar en dos regímenes diferentes, cada uno de los cuales produce un comportamiento distinto en la respuesta del sensor (**Figura 91**). En el primer modelo, se supone que la cantidad de secuencia diana que hibrida con la sonda de captura es inferior a la cantidad de secuencia diana presente en la muestra, siendo esta última la que limita el proceso de hibridación. En estas condiciones, el proceso de hibridación queda descrito por una isoterma hiperbólica de Langmuir definida por la siguiente ecuación:

$$S([T]) = S_0 + (S_B - S_0) \frac{[T]}{[T] + K_D} \quad (6)$$

donde $S([T])$ es la señal medida para una concentración de DNA diana $[T]$, S_0 es la señal observada en ausencia de DNA diana y S_B es la señal observada en presencia de concentraciones de DNA diana al nivel de saturación. Estas condiciones se dan cuando el volumen de muestra es alto y la afinidad de la sonda por su diana es baja, requiriéndose altas concentraciones de DNA diana para detectar el proceso de hibridación. En este caso se hablará de “constante de disociación (K_D) verdadera” (punto medio de la isoterma), que definirá el LD a alcanzar.

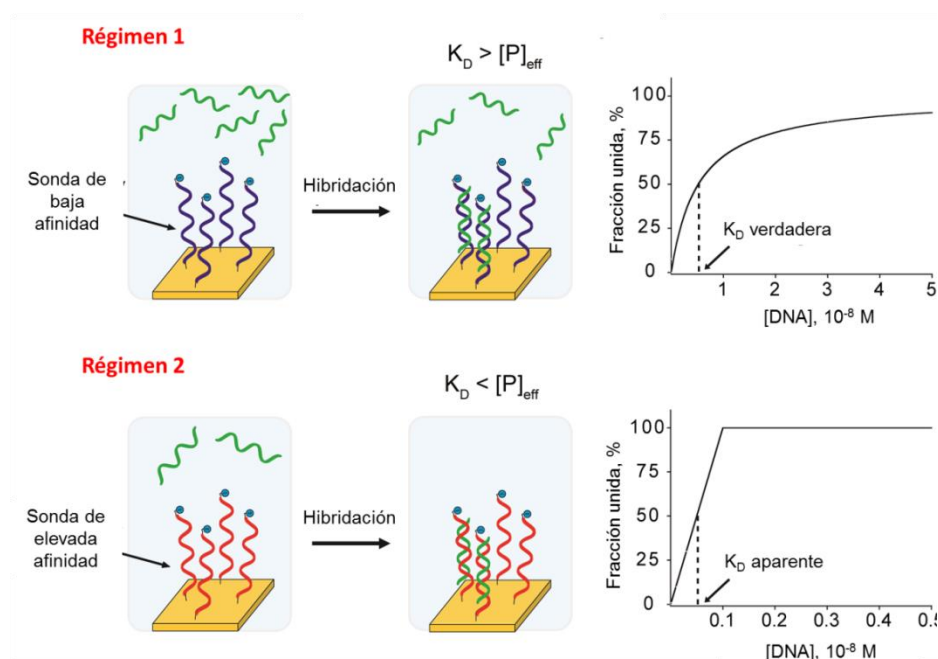


Figura 91. Representación esquemática de los dos modelos de comportamiento supuestos para el estudio de la influencia de las variables implicadas en la configuración del genosensor sobre la afinidad entre la sonda de captura y la secuencia diana.

Por otra parte, en el segundo modelo se supone que el proceso está limitado por el número absoluto de moléculas de secuencia diana presentes en la muestra (que dependerá tanto del volumen como de la concentración de la muestra) en relación con la cantidad inmovilizada de sonda (que depende de la densidad y de la superficie del sensor). De esta manera, si la K_D es muy baja, cada molécula de secuencia diana presente en la muestra se unirá a la sonda de captura hasta el punto de saturación. En estas condiciones, el proceso viene definido por un sistema bilinear, según la ecuación:

$$S([T]) = S_0 + (S_B - S_0) \frac{[T]}{[P]_{eff}} \quad (7)$$

donde $[P]_{eff}$ es la concentración efectiva de sonda, la mitad de cuyo valor define la “constante de disociación (K_D) aparente”.

En la práctica, discriminar entre ambos modelos supone ciertas dificultades, lo que conlleva a cuestionar la afinidad y especificidad real del sensor. Para ayudar a aclarar esta discriminación, en este trabajo y mediante el empleo de un genosensor electroquímico modelo se ha realizado un estudio cuantitativo exhaustivo de los factores que determinan ambos regímenes, como son la densidad de la sonda de captura (expresada como el número de moles de DNA inmovilizados por unidad de área), el volumen de muestra y la K_D verdadera. Los resultados más relevantes de estos estudios se comentarán a continuación.

4.4.1. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA SONDA DE CAPTURA

La cantidad de sonda inmovilizada sobre la superficie del electrodo es un parámetro que afecta en gran medida al funcionamiento del genosensor [Loaiza, 2007].

En el modelo de genosensor empleado en este trabajo se ha observado una elevada afinidad de la sonda por la secuencia diana, por lo que operará en el segundo régimen descrito anteriormente para un volumen de muestra, densidad de sonda y

área de superficie del sensor determinados. Sin embargo, se ha querido estudiar el comportamiento del genosensor al modificar estas condiciones, para lo que se empezó modificando la concentración de la sonda de captura. Como puede observarse en la **Figura 92**, la K_D aparente presentaba una dependencia lineal con el aumento de la densidad de sonda inmovilizada, es decir, la verdadera afinidad de la sonda de captura por su secuencia diana era mucho menor que la concentración efectiva de moléculas de la sonda diana en la muestra y, por lo tanto, cada molécula diana en la muestra se unía a una molécula de sonda hasta el punto de saturación de la misma.

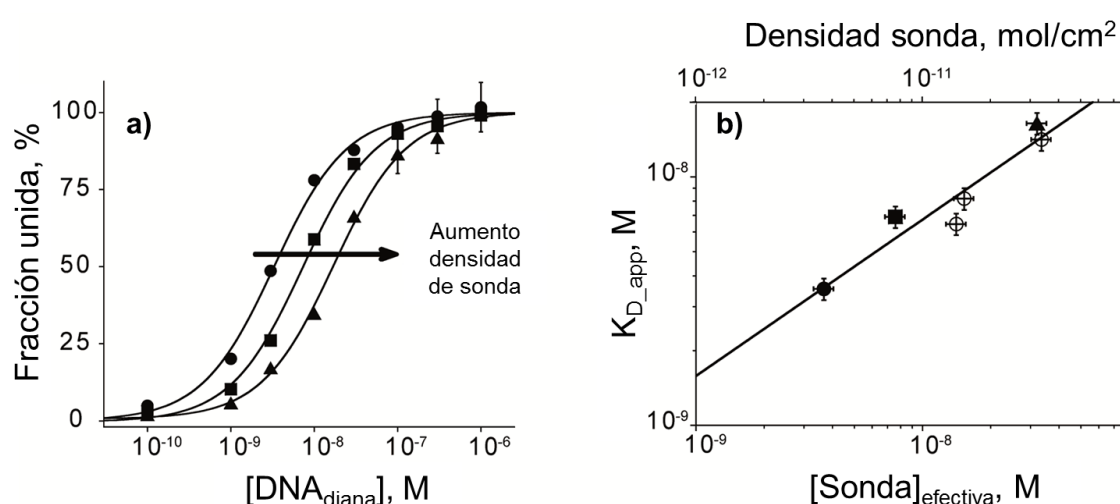


Figura 92. Influencia de la densidad de la sonda de captura inmovilizada sobre el valor de la K_D aparente. a) Curvas de afinidad obtenidas para diferentes concentraciones de sonda (de izquierda a derecha: 10 nM, 100 nM y 2 μ M). b) Dependencia lineal de la K_D aparente con la densidad de la sonda (valores de K_D aparente obtenidos con genosensores fabricados con distinta concentración de sonda: 10, 25, 50, 100, 500 nM y 2 μ M). Condiciones experimentales: área del electrodo = 0.07 cm²; volumen = 70 μ L. Barras de error correspondientes a 3 \times s (n = 3), (a modo de simplificación, sólo se han representado las barras de error en algunos puntos).

4.4.2. EFECTO DEL VOLUMEN DE INCUBACIÓN DE LA SONDA DIANA

Se evaluó también la respuesta del genosensor en función de la variación del volumen de incubación de la disolución de secuencia diana. En la **Figura 93** se muestran cuatro curvas de afinidad obtenidas con genosensores fabricados utilizando diferentes volúmenes de una disolución de DNA diana de concentración fija (10 nM).

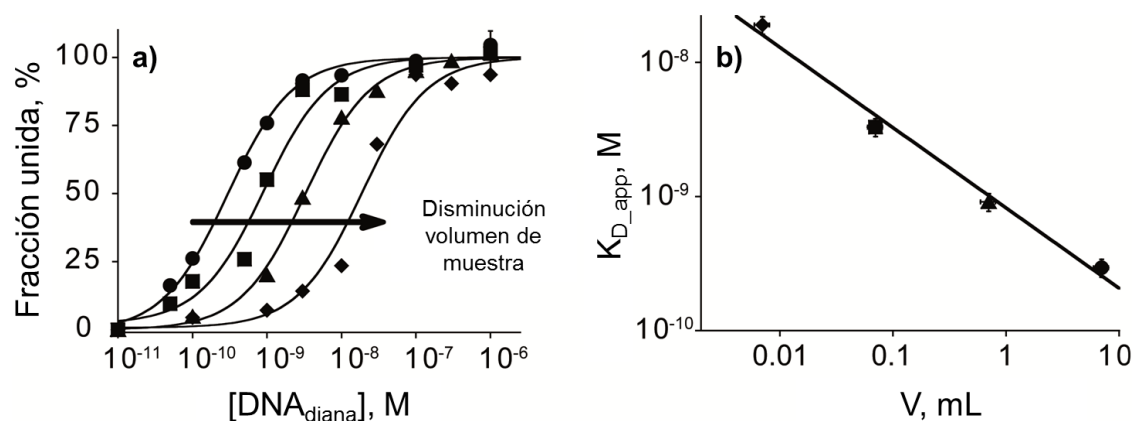


Figura 93. Influencia del volumen de incubación sobre el valor de la K_D aparente. a) Curvas de afinidad obtenidas para diferentes volúmenes (de izquierda a derecha: 70 mL, 700, 70 y 7 μ L). b) Dependencia de la K_D aparente con el volumen de DNA diana. Condiciones experimentales: área del electrodo = 0.07 cm²; [sonda diana] = 10 nM. Barras de error correspondientes a $3\times s$ ($n = 3$), (a modo de simplificación, sólo se han representado las barras de error en algunos puntos).

Como puede observarse, al disminuir dicho volumen aumentaba la concentración de la secuencia diana en disolución y, consecuentemente, el valor de la K_D aparente. Con el menor volumen de estudio (7 μ L) se obtuvo un valor de K_D aparente casi dos órdenes de magnitud superior al obtenido con el mayor volumen ensayado (70 mL).

4.4.3. EFECTO DE LA LONGITUD DE LA CADENA DE LA Sonda DIANA

Por otra parte, se estudió la influencia de la longitud de la secuencia diana sobre la respuesta del genosensor. Para ello, se estimó la afinidad aparente de varios genosensores preparados de la misma forma, que fueron sometidos a un proceso de hibridación con secuencias de DNA de diferente longitud: desde 13 a 27 bases, con menor y mayor afinidad por la sonda de captura (de 27 bases), respectivamente. Mientras que sí se observó un aumento de la supresión de señal con las secuencias de mayor número de bases (debido al aumento de rigidez de la doble hélice), no se observó ningún cambio en la K_D aparente calculada (3.6 ± 0.3 nM) al variar la longitud de la secuencia (**Figura 94**).

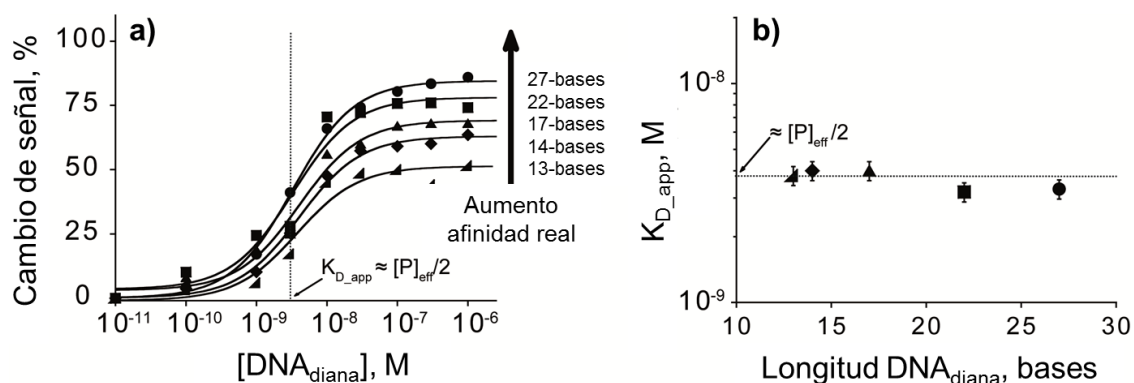


Figura 94. Influencia de la longitud de las secuencias de DNA diana sobre el valor de la K_D aparente. a) Curvas de afinidad obtenidas para secuencias diana de diferente longitud. b) Comportamiento constante de la K_D aparente con la variación de la longitud de la secuencia diana. Condiciones experimentales: área del electrodo = 0.07 cm²; [sonda] = 10 nM; volumen = 70 µL. Barras de error correspondientes a 3×s (n = 3).

Una vez más, este comportamiento puede explicarse porque en este régimen de estudio la afinidad aparente está definida por el número absoluto de moléculas de secuencia diana presentes en la muestra en relación con la cantidad de sonda inmovilizada, por lo que la K_D no varía con la longitud de la secuencia diana.

4.4.4. ESTUDIOS DE ESPECIFICIDAD

Se ha investigado la especificidad del genosensor, realizando el proceso de hibridación con secuencias diana de diferente longitud perfectamente complementarias (PM) y con una base desapareada (MM) (**Figura 95**). Se comprobó que, mientras que la afinidad aparente obtenida con las tres secuencias perfectamente complementarias fue similar, solamente en el caso de la secuencia de menor longitud (13 bases) se pudo discriminar entre el valor de la K_{D_app} de la PM (3.8 ± 0.4 nM) y de la MM (71.2 ± 0.6 nM), ya que era el caso en el que la afinidad de la sonda por la secuencia diana era menor y, por lo tanto, la K_D aumentaba. La afinidad entre las cadenas de DNA, en este caso, era lo suficientemente pobre como para encontrarse en el primer régimen de estudio propuesto anteriormente.

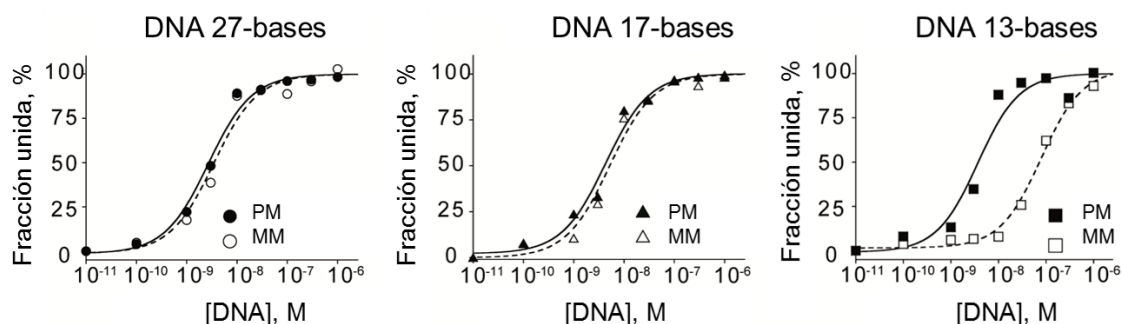


Figura 95. Curvas de afinidad obtenidas con secuencias diana perfectamente complementarias (PM) y con una base desapareada (MM) de diferente longitud (27, 17 y 13 bases). Otras condiciones experimentales como en la **Figura 94**.

A la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la afinidad de biosensores basados en la inmovilización de biomoléculas en la superficie no sólo está definida por la afinidad de la propia sonda de captura sino, y en mayor medida, por la concentración efectiva de la misma. En estas circunstancias, la afinidad observada y, por lo tanto, el LD y la especificidad del sensor, dependerán de la densidad de la sonda inmovilizada, del área de la superficie electródica e incluso del volumen de muestra empleado. De esta forma, la mínima afinidad observada (y por tanto el LD) depende más de la configuración experimental del sensor que de la propia afinidad de la sonda, explicándose así la importancia de la optimización exhaustiva de las variables experimentales involucradas en la fabricación de genosensores de superficie.

5. CONCLUSIONES/ CONCLUSIONS

In this doctoral thesis, new electrochemical immunosensors and genosensors, and analytical strategies for the individual or multiplexed determination of different bacteria, virulence factors and cardiac biomarkers in food and clinical samples have been developed.

In general, the implementation of these electrochemical biosensors involved different functionalized magnetic microparticles as immobilization surfaces and different types of screen-printed electrodes as transducers.

The presented work involves the development of: a) different amperometric magneto-biosensors for the individual determination of *S. pneumoniae*, *S.aureus*/Protein A, cTnT, NT-proBNP and CRP; b) a multiplexed magnetoimmunosensor for the simultaneous NT-proBNP and CRP determination; c) an amperometric integrated immunosensor for the individual determination of Lp(a); d) an integrated DNA sensor used in the study of the determinants of the limit of detection and the specificity of surface-based biosensors.

All these biosensors, involving the use of suitable receptors, appropriate assay modes and innovative designs, have demonstrated to be competitive with other classical and analytical procedures.

The analytical characteristics achieved with the developed biosensors are remarkably better than those reported for other previous approaches described in literature. Thus, they mainly outstand in terms of operational simplicity, speed of analysis and sensitivity. Moreover, both the individual and the multiplexed determination of different bacteria and cardiac biomarkers in food and clinical samples has been demonstrated at the minimum established legislated or cut-off values, to predict the probability of bacterial diseases/outbreaks or cardiovascular risk. Also, the developed methodologies can be applied to the analysis of real food and clinical samples without laborious pretreatments (only a simple dilution in some cases) or pre-concentration steps.

It is also worth to mention that this is the first time, to our knowledge, that a magnetoimmunosensor based on the use of novel antibodies is reported for *S. pneumoniae* detection, as well as, the development of an electrochemical magneto-immuno-daPCR approach which improved significantly the sensitivity of the determination.

The first disposable amperometric magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of two cardiac biomarkers (NT-proBNP and CRP) in human serum is described, by coupling indirect competitive and sandwich assay configurations, respectively, onto the same electrode platform, which makes it possible to match the clinically relevant concentration ranges for both cardiac biomarkers, constituting an attractive alternative for its implementation as an on-site clinical diagnosis device.

The development of the integrated immunosensor for Lp(a) determination has involved the implementation, for the first time, of an innovative and easy to carry out design based on SPCEs modified with a dense layer of a commercial long alkyl chain NTA ligand for the covalent immobilization of the capture antibodies.

Briefly, the short analysis time required, the simplicity of the involved experimental procedures, and the easy automation and miniaturization of the employed instrumentation make the developed electrochemical bioplatfroms and implemented methodologies useful, promising and attractive analytical tools for the development of user-friendly portable devices for onsite analysis.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [Adornetto, 2012] Adornetto G.; Volpe, G.; De Stefano, A.; Martini, S.; Gallucci, G.; Manzoni, A.; Bernardini, S.; Mascini, M.; Moscone, D. *Anal. Bioanal. Chem.* 403 (2012) 1191-1194.
- [Al-Khafaji, 2012] Al-Khafaji, Q. A. M.; Harris, M.; Tombelli, S.; Laschi, S.; Turner, A. P. F.; Mascini, M.; Marrazza, G. *Electroanal.* 24 (2012) 73-742.
- [Anderson, 2005] Anderson, L. *Journal of Physiology* 563 (2005) 23-60.
- [Anderson, 2008] Anderson, G. P.; Taitt, C. R. *Sensor Lett.* 6 (2008) 213-218.
- [Avello, 2010] Avello, N.; Prieto, B.; Molina, B. D.; Rodríguez-Lambert, J. L.; Álvarez, F. V. *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 161-166.
- [Baeumner, 2003] Baeumner, A. J. *Anal. Bioanal. Chem.* 377 (2003) 434-445.
- [Balasubramanian, 2007] Balasubramanian, S.; Sorokulova, I. B.; Vodyanoy, V. J.; Simonian, A. L. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 948-955.
- [Baptista, 2008] Baptista, P.; Pereira, E.; Eaton, P.; Doria, G.; Miranda, A.; Gomes, I.; Quaresma, E.; Franco, R. *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 943-950.
- [Berti, 2009] Berti, F.; Laschia, S.; Palchetti, I.; Rossier, J. S.; Reymond, F.; Mascinia, M.; Marrazza, G. *Talanta* 77 (2009) 971-978.
- [Bobrowski, 2014] Bobrowski, A.; Królicka, A.; Maczuga, M.; Zarebski, J. *Sensor Actuat. B-Chem.* 191 (2014) 291-297.
- [Boujday, 2008] Boujday, S.; Briandet, R.; Salmain, M.; Herry, J. M.; Marnet, P. G.; Gautier, M.; Pradier, C. M. *Microchim. Acta.* 163 (2008) 203-209.
- [Braiek, 2012] Braiek, M.; Rokbani, K. B.; Chrouda, A.; Mrabet, B.; Bakhrouf, A.; Maaref, A.; Jaffrezic, R. N. *Biosensors* 2 (2012) 417-426.
- [Brisabois, 1997] Brisabois, A.; Lafarge, V.; Brouillaud, A.; de Buyser, M. L.; Collette, C.; Garin-Bastuji, B.; Thorel, M. F. *Rev. Sci. Tech.* 16 (1997) 452-471.
- [Brückl, 2005] Brückl, H.; Panhorst, M.; Schotter, J.; Kamp, P.B.; Becker, A. *IEE Proc.-Nanobiotechnol.* 152 (2005) 41-46.
- [Bryan, 2013] Bryan, T.; Luo, X.; Bueno, P. R.; Davis, J. J. *Biosens. Bioelectron.* 39 (2013) 94-98.

- [Campuzano, 2010] Campuzano, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Yuste, J.; Pedrero, M.; García, J. L.; García, P.; García, E.; Pingarrón, J. M. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1225-1230.
- [Campuzano, 2011] Campuzano, S.; Pedrero, M.; García, J. L.; García, E.; García, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 2413-2420.
- [Campuzano, 2014] Campuzano, S.; Salema, V.; Moreno-Guzmán, M.; Gamella, M.; Yáñez-Sedeño, P.; Fernández, L. A.; Pingarrón, J. M. *Biosens. Bioelectron.* 52 (2014) 255-260.
- [Centi, 2007] Centi, S.; Laschi, S.; Mascini, M. *Talanta* 73 (2007) 394-399.
- [Centi, 2008] Centi, S.; Messina, G.; Tombelli, S.; Palchetti, I.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1602-1609.
- [Centi, 2009] Centi, S.; Sanmartin, L. B.; Tombelli, S.; Palchetti, I.; Mascini, M. *Electroanal.* 21 (2009) 1309-1315.
- [Cerf, 2011] Cerf, O.; Donnat, E. Farm HACCP Working Group. *Food Control* 22 (2011) 1839-1843.
- [Chai, 2011] Chai, C.; Liu, G.; Yao, B. *Sensor. Actuat B-Chem.* 152 (2011) 1-7.
- [Chan, 2013] Chan, K. Y.; Ye, W. W.; Zhang, Y.; Xiao, L. D.; Leung, P. H-M.; Li, Y.; Yang, M. *Biosens. Bioelectron.* 41 (2013) 532-537.
- [Chapman, 1994] Chapman, M. J.; Huby, T.; Nigon, F.; Thillet, J. *Atherosclerosis*. 110 (1994) 69-75.
- [Chen, 2007] Chen, L.; Deng, L.; Liu, L.; Peng, Z. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1487-1492.
- [Chen, 2008] Chen, Z. G. *Bioprocess Biosyst. Eng.* 31 (2008) 345-350.
- [Chilkoti, 1995] Chilkoti, A.; Stayton, P.S. *J. Am. Chem. Soc.* 117 (1995) 10622-10628.
- [Chou, 2007] Chou, C.; Hsu, H. Y.; Wu, H. T.; Tseng, K. Y.; Chiou, A.; Yu, C. J.; Lee, Z. Y.; Chan, T. S. *J. Biomed. Opt.* 12 (2007) 024025/1-024025/9.
- [Clarke, 2009] Clarke, R.; Peden, J. F.; Hopewell, J. C.; Kyriakou, T.; Goel, A.; Heath, S.C.; Parish, S.; Barlera, S.; Franzosi, M. G.; Rust, S.; Bennett, D.; Silveira, A.; Malarstig, A.; Green, F. R.; Lathrop, M.; Gigante, B.; Leander, K.; Seedorf, U.; Hamsten, A.; Collins, R.; Watkins, H.; Farrall, M. *N. Engl. J. Med.* 361 (2009) 2518-2528.
- [Compton, 1993] Compton, R. G.; Fisher, A.; Wellington, R.; Dobson, P. J.; Leigh, P. A. *J. Phys. Chem.* 97 (1993) 10410-10415.

- [**Conzuelo, 2012**]: Conzuelo, F.; Gamella, M.; Campuzano, S.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta.* 737 (**2012**) 29-36.
- [**Conzuelo 2013**] Conzuelo, F.; Gamella, M.; Campuzano, S.; Martínez-Ruiz, P.; Esteban-Torres, M.; de las Rivas, B.; Reviejo, A. J.; Muñoz, R.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chem.* 85 (**2013**) 3246-3254.
- [**Corrigan, 2012**] Corrigan, D. k.; Schulze, H.; Henihan, G.; Ciani, I.; Giraud, G.; Terry, J. G.; Walton, A. J.; Pethig, R.; Ghazal, P.; Crain, J.; Campbell, C. J.; Mount, A. R.; Bachmann, T. T. *Biosens. Bioelectron.* 34 (**2012**) 178-184.
- [**Cosnier, 1999**] Cosnier, S.; Gondran, C. *Analisis* 27 (**1999**) 558-564.
- [**D’Orazio, 2003**] D’Orazio, P. *Clin. Chim. Acta.* 334 (**2003**) 41-69.
- [**Darder, 2000**] Darder, M.; Casero, E.; Pariente, F.; Lorenzo, E. *Anal. Chem.* 72 (**2000**) 3784-3792.
- [**Deegan, 2001**] Deegan, P. B.; Lafferty, M. E.; Blumsohn, A.; Henderson, L. S.; McGregor, E. *Kidney Int.* 60 (**2001**) 2399-2405.
- [**de los Toyos, 1996**] de los Toyos, J.R.; Méndez, F.J.; Aparicio, J.F.; Vázquez, F.; García Suárez, M.d.M.; Fleites, A.; Hardisson, C.; Morgan, P.J.; Andrew, P.W.; Mitchell, T.J. *Infect. Immun.* 64 (**1996**) 480-484.
- [**de Vasconcelos, 2009**] de Vasconcelos, E. A.; Peres, N. G.; Pereira, C. O.; da Silva, V. L.; da Silva Jr., E. F.; Dutra, R. F. *Biosens. Bioelectron.* 25 (**2009**) 870-876.
- [**Díaz-González, 2006**] Díaz-González, M.; González-García, M. B.; Costa-García, A. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 113 (**2006**) 1005-1011.
- [**Ding, 2013**] Ding, P.; Liu, R.; Liu, S.; Mao, X.; Hu, R.; Li, G. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 188 (**2013**) 1277-1283.
- [**Dong, 2012**] Dong, J.; Guo, H.; Yang, R.; Li, H.; Wang, S.; Zhang, J.; Zhou, W.; Chen, W. *Clin. Chim. Acta* 413 (**2012**) 1071-1076.
- [**D’Orazio, 2003**] D’Orazio, P. *Clin. Chim. Acta.* 334 (**2003**) 41-69.
- [**Dortet, 2009**] Dortet, L.; Ploy, M. C.; Poyart, C.; Raymond, J.; *ORP Ile de France Ouest. Diagn. Micr Infec. Dis.* 65 (**2009**) 49-57.
- [**Du, 2010**] Du, D.; Zou, Z. X.; Shin, Y. S.; Wang, J.; Wu, H.; Engelhard, M. H.; Liu, J.; Aksay, I. A.; Lin, Y. H. *Anal. Chem.* 82 (**2010**) 2989-2995.
- [**Duggleby, 1983**] Duggleby, C. J.; Jones, S. A. *Nucleic Acid Res.* 11 (**1983**) 3065-3076.

- [Dutra, 2007] Dutra, R. F.; Kubota, L. T. *Clin. Chim. Acta* 376 (2007) 114-120.
- [Eguílaz, 2010] Eguílaz, M.; Moreno-Guzmán, M.; Campuzano, S.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 517-522.
- [Ehara, 2008] Ehara, N.; Fukushima, K.; Kakeya, H.; Mukae, H.; Akamatsu, S.; Kageyama, A.; Saito, A.; Kohno, S. *J. Med. Microbiol.* 57 (2008) 820-826.
- [Ellington, 1990] Ellington, A. D.; Szostak, J. W. *Nature* 346 (1990) 818-822.
- [Emaneini, 2011] Emaneini, M.; Khoramrooz, S. S.; Taherikalani, M.; Jabalameli, F.; Aligholi, M. *Int. J. Pediatr. Otorhi.* 75 (2011) 1446-1449.
- [Erdem, 2005] Erdem, A.; Ariksoysal, D. O.; Karadeniz, H.; Kara, P.; Sengonul, A.; Sayiner, A. A.; Ozsoz, M. *Electrochem. Commun.* 7 (2005) 815-820.
- [Erdem, 2013] Erdem, A.; Congura, G.; Eksina, E. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 188 (2013) 1089-1095.
- [Escamilla-Gómez, 2007] Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón J. M. *Electroanal.* 19 (2007) 1476-1482.
- [Escamilla-Gómez, 2008^a] Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. *Anal Bioanal. Chem.* 391 (2008) 837-845.
- [Escamilla-Gómez, 2008^b] Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. *Talanta* 77 (2008) 876-881.
- [Escamilla-Gómez, 2009] Escamilla-Gómez, V.; Hernández-Santos, D.; González-García, M. B.; Pingarrón-Carrazón, J. M.; Costa-García, A. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2678-2683.
- [Esteban-Fernández de Ávila, 2013] Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Salvador, J-P; Marco, M-P; Pingarrón, J. M. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 188 (2013) 212-220.
- [Esteban-Fernández de Ávila, 2014] Esteban-Fernández de Ávila, B.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Salvador, J-P; Marco, M-P; Pingarrón, J. M. *Anal. Bioanal. Chem.* (2014), enviado.
- [Falentin, 2012] Falentin, H.; Henaff, N.; Le Bivic, P.; Deutsch, S. M.; Parayre, S. *Food Microbiol.* 29 (2012) 132-140.

- [**Fanjul-Bolado, 2007**] Fanjul-Bolado, P.; Hernández-Santos, D.; González-García, M. B.; Costa-García, A. *Anal. Chem.* 79 (2007) 5272-5277.
- [**Fähnrich, 2003**] Fähnrich, K. A.; Pravda, M.; Guilbault, G. G. *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 73-82.
- [**Feng, 2012**] Feng, L. N.; Bian, Z. P.; Peng, J.; Jiang, F.; Yang, G. H.; Zhu, Y. D.; Yang, D.; Jiang, L. P.; Zhu, J. J. *Anal. Chem.* 84 (2012) 7810-7815.
- [**Ferretti, 2000**] Ferretti, S.; Paynter, S.; Russell, D. A.; Sapsford, K.E.; Richardson, D.J. *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 530-540.
- [**Fonseca, 2011**] Fonseca, R. A. S.; Ramos-Jesús, J.; Kubota, L. T.; Dutra, R. F. *Sensors* 11 (2011) 10785-10797.
- [**Fotou, 2011**] Fotou, K.; Tzora, A.; Voidarou, Ch.; Alexopoulos, A.; Plessas, S.; Avgeris, I.; Bezirtzoglou, E.; Akrida-Demertzi, K.; Demertzis, P. G. *Anaerobe* 17 (2011) 315-319.
- [**Gan, 2012**] Gan, N.; Meng, L.; Hu, F.; Cao, Y.; Wu, Y.; Jia, L.; Zheng, L. *Applied Mechanics and Materials* 110 (2012) 519-526.
- [**García-Suárez, 2009**] García-Suárez, M. D. M.; Cron, L. E.; Suárez-Álvarez, B.; Villaverde, R.; González-Rodríguez, I.; Vázquez, F.; Hermans, P. W. M.; Méndez, F. J. *Clin. Microbiol. Infect.* 15 (2009) 443-453.
- [**Gaw, 1997**] Gaw, A.; Gourlay, C. W. D.; Brown, E. A.; Bell, M. A. *Clin. Chim. Acta* 261 (1997) 175-183.
- [**Gebicka, 1997**] Gebicka, L.; Gebicki, J. L. *J Enzym. Inhib.* 12 (1997) 133-141.
- [**Gerhardt, 2000**] Gerhardt, W.; Nordin, G.; Herbert, A. K.; Burzell, B. L.; Isaksson, A.; Gustavsson, E.; Haglund, S.; Muller-Bardorff, M.; Katus, H. A. *Clin. Chem.* 416 (2000) 817-820.
- [**Godino, 2010**] Godino, N.; del Campo, F. J.; Muñoz, F. X.; Hansen, M. F.; Kutter, J. P.; Snakenborg, D. *Lab Chip.* 10 (2010) 1841-1847.
- [**Gomes-Filho, 2013**] Gomes-Filho, S. L. R.; Dias, A. C. M. S.; Silva, M. M. S.; Silva, B. V. M.; Dutra, R. F. *Microchem. J.* 109 (2013) 10-15.
- [**Gómez, 2006**] Gómez Cerique, J. A. *Clin. Invest. Arterioscl.* 18 (2006) 96-98.
- [**Gómez, 2009**] Gómez, M.; Valle, V.; Arós, F.; Sanz, G.; Sala, J.; Fiol, M.; Bruguera, J.; Elosua, R.; Molina, L.; Martí, H.; Covas, M. I.; Rodríguez-Llorián, A.; Fitó, M.; Suárez-Pinilla, M. A.; Amezcaga, R.; Marrugat, J. *Rev. Esp. Cardiol.* 62 (2009) 373-82.

- [Gooding, 1999] Gooding, J. J.; Hibbert, D. B. *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 525-533.
- [Gul, 2007] Gul, O.; Calay, E.; Sezerman, U.; Basaga, H.; Gurbuz, Y. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 125 (2007) 581-588.
- [Hamadi, 2014] Hamadi, F.; Asserne, F.; Elabed, S.; Bensouda, S.; Mabrouki, M.; Latrache, H. *Food Control* 38 (2014) 104-108.
- [Harvey, 2008] Harvey, R. A.; Champe, P. C.; Fischer, B. D. *Microbiología*, Ed. Wolters Kluwer / Lippincot W&W, Barcelona (2008) 84-86.
- [Hasanzadeh, 2013] Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; Eskandani, M.; de la Guardia, M.; Omidinia, E. *Trends in Anal. Chem.* 49 (2013) 20-30.
- [Häussling, 1991] Häussling, L.; Michel, B.; Ringsforf, H.; Rohrer, H. *Angew. Chem.* 30 (1991) 569-572.
- [Hayat, 2011] Hayat, A.; Barthelmebs, L.; Sassolas, A.; Marty, J. L. *Talanta* 85, (2011) 513–518.
- [Hernández-Santos, 2004] Hernández-Santos, D.; Díaz-González, M.; González-García, M. B.; Costa-García, A. *Anal. Chem.* 76 (2004) 6887-6893.
- [Hernández-Santos, 2005] Hernández-Santos, D.; González-García, M. B.; Costa-García, A. *Anal. Chem.* 77 (2005) 2868-2874.
- [Heyries, 2009] Heyries, K. A.; Mandon, C. A.; Ceriotti, L.; Pontic, J.; Colpo, P.; Blum, L. J.; Marquette, C. A. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1146-1152.
- [Huang, 2008^a] Huang, S.; Ge, S.; He, L.; Cai, Q.; Grimes, C. A. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1745-1748.
- [Huang, 2008^b] Huang, Y.; Bell, M. C.; Suni, I. I. *Anal. Chem.* 80 (2008) 9157-9161.
- [Huang, 2010] Huang, S.-J.; Wang, Y.-J.; Cai, Q.-Y.; Fang, J.-D. *Chin. J. Anal. Chem.* 38 (2010) 105-108.
- [Hulanicki, 1991] Hulanicki, A.; Glab, S.; Ingman, F. *Pure & App. Chem.* 63 (1991) 1247-1250.
- [Huy, 2011] Huy, T. Q.; Hanh, N. T. H.; Chung, P. V.; Anh, D. D.; Nga, P. T.; Tuan, M. A. *Appl. Surf. Sci.* 257 (2011) 7090-7095.
- [Ibupoto, 2012] Ibupoto, Z. H.; Jamal, N.; Khun, K.; Willander, M. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 166 (2012) 809-814.

- [Jaffe, 2006] Jaffe, A. S.; Babuin, L.; Apple, F. S. *J. Am. Coll. Cardiol.* 48 (2006) 1-11.
- [James, 2000] James, W. (2000). In: Mayers, R.A. (Ed.), *Aptamers. Encyclopaedia of Analytical Chemistry*, vol. 484. John Wiley and Sons, LTD, London.
- [Janata, 2009] Janata, J.; *Principles of Chemical Sensors. 2^a ed.* Springer, New York (2009).
- [Jiang, 2008] Jiang, X.; Li, D.; Xu, X.; Ying, Y.; Li, Y.; Ye, Z.; Wang, J. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 1577-1587.
- [Jung, 2007] Jung, Y.; Lee, J.; Jung, H.; Chung, B. *Anal. Chem.* 79 (2007) 6534-6541.
- [Jung, 2009] Jung, J. W.; Jung, S. H.; Yoo, J. O.; Suh, I. B.; Kim, Y. M.; Ha, K. S. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1469-1473.
- [Justino, 2013] Justino, C. I. L.; Freitas, A. C.; Amaral, J. P.; Rocha-Santos, T. A. P.; Cardoso, S.; Duarte, A. C. *Talanta* 108 (2013) 165-170.
- [Kaijalainen, 2002] Kaijalainen, T.; Rintamäki, S.; Herva, E.; Leinonen, M. *J. Microbiol. Meth.* 51 (2002) 111-118.
- [Karimian, 2013] Karimian, N.; Vagin, M.; Zavar, M. H. A.; Chamsaz, M.; Turner, A. P. F.; Tiwari, A. *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 492-498.
- [Kawamura, 1995] Kawamura, Y.; Hou, X. G.; Sultana, F.; Miura, H.; Ezaki, T. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45 (1995) 406-408.
- [Kemmler, 2009] Kemmler, M.; Koger, B.; Sulz, G.; Sauer, U.; Schleicher, E.; Preininger, C.; Brandenburg, A. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 139 (2009) 44-51.
- [Kesmen, 2013] Kesmen, Z.; Celebi, Y.; Güllüce, A.S.; Yetim, H. *Food Control.* 34 (2013) 47-49.
- [Kim, 2009] Kim, J. S.; Anderson, G. P.; Erickson, J. S.; Golden, J. P.; Nasir, M.; Ligler, F. S. *Anal. Chem.* 81 (2009) 5426-5432.
- [Kissinger, 2005] Kissinger, P.; T. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2512-2516.
- [Kozioł-Montewka, 2006] Kozioł-Montewka, M.; Szczepanika, A.; Baranowicz, J.; Jóźwiak, L.; Książek, A.; Kaczor, D. *Microbiol. Res.* 161 (2006) 281-287.
- [Krämer, 2011] Krämer, P. M.; Kess, M.; Kremmer, E.; Schulte-Hostede, S. *Analyst* 136 (2011) 692-695.
- [Kumar, 2011] Kumar, J.; D'Souza, S. F. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4289-4293.

- [Kumar, 2012] Kumar, D.; Prasad, B. B. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 171 (2012) 1141-1150.
- [Kurita, 2008] Kurita, R.; Hirata, Y.; Yabuki, S.; Yokota, Y.; Kato, D.; Sato, Y.; Mizutani, F.; Niwa, O. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 130 (2008) 320-325.
- [Lacks, 1960] Lacks, S.; Hotchkiss, R. D. *Biochim. Biophys. Acta.* 39 (1960) 508-597.
- [Lahiri, 1999] Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* 71 (1999) 777-790.
- [Lai, 2011] Lai, G. S.; Yan, F.; Wu, J.; Leng, C. A.; Ju, H. X. *Anal. Chem.* 83 (2011) 2726-2732.
- [Lao, 2005] Lao, R.; Song, S.; Wu, H.; Wang, L.; Zhang, Z.; He, L.; Fan, C. *Anal. Chem.* 77 (2005) 6475-6480.
- [Lazcka, 2007] Lazcka, O.; Del Campo, F. J.; Muñoz, F. X. *Biosen. Bioelectron.* 22 (2007) 1205-1217.
- [Le Loir, 2003] Le Loir, Y.; Baron, F.; Gautier, M. *Genet. Mol. Res.* 2 (2003) 63-76.
- [Lee, 2009] Lee, Y. G.; Wu, H. Y.; Hsu, C. L.; Liang, H. J.; Yuan, C. J.; Jang, H. D. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 141 (2009) 575-580.
- [Lee, 2011] Lee, W. B.; Chen, Y. H.; Lin, H. I.; Shiesh, S. C.; Lee, G. B. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 157 (2011) 710-721.
- [Lermo, 2009] Lermo, A.; Fabiano, S.; Hernández, S.; Galve, R.; Marco, M. P.; Alegret, S.; Pividori, M. I. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2057-2063.
- [Levinson, 2002] Levinson, S. S.; Miller, J. J. *Clin. Chim. Acta.* 325 (2002) 1-15.
- [Li, 2008] Li, J.; Gao, H. *Electroanal.* 20 (2008) 881-887.
- [Li, 2012] Li, M.; Li, Y.-T.; Li, D.-W.; Long, Y.-T. *Anal. Chim. Acta.* 734 (2012) 31-44.
- [Liang, 2012] Liang, W.; Li, Y.; Zhang, B.; Zhang, Z.; Chen, A.; Qi, D.; Yi, W.; Hu, C. *Biosens. Bioelectron.* 31 (2012) 480-485.
- [Liébana, 2009^a] Liébana, S.; Lermo, A.; Campoy, S.; Barbé, J.; Alegret, S.; Pividori, M. I. *Anal. Chem.* 81 (2009) 5812-5820.
- [Liébana, 2009^b] Liébana, S.; Lermo, A.; Campoy, S.; Cortés, M. P.; Alegret, S.; Pividori, M. I. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2009) 510-513.
- [Lim, 2012] Lim, S. S.; Vos, T.; Flaxman, A. D.; Danaei, G.; Shibuya, K.; Adair-Rohani, H.; et al. *Lancet* 380 (2012) 2224-2260.
- [Lin, 2004] Lin, Y.; Lu, F.; Tu, Y.; Ren, Z. *Nanoletters* 4 (2004) 191-195.

- [Lin, 2008] Lin, C. C.; Chen, L. C.; Juang, C. H.; Ding, S. J.; Chang, C. C.; Chang, H. C. *J. Electroanal. Chem.* 619 (2008) 39-45.
- [Liu, 2007] Liu, G.; Lin, Y. *J. Am. Chem. Soc.* 129 (2007) 10394-10401.
- [Liu, 2009] Liu, X.P.; Deng, Y.J.; Jin, X.Y.; Chen, L.G.; Jiang, J.H.; Shen, G.L.; Yu, R.Q. *Anal. Biochem.* 389 (2009) 63-68.
- [Liu, 2011] Liu, J. T.; Chen, C. J.; Ikoma, T.; Yoshioka, T.; Cross, J. S.; Chang, S. J.; Tsai, J. Z.; Tanaka, J. *Anal. Chim. Acta* 703 (2011) 80-86.
- [Liu, 2014] Liu, N.; Li, X.; Ma, X.; Ou, G.; Gao, Z. *Sens. Actuat B-Chem.* 191 (2014) 326-331.
- [Loaiza, 2007] Loaiza, O. A.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M. *Talanta* 73 (2007) 838-844.
- [Loaiza, 2008] Loaiza, O. A.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pividori, M. I.; García, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chem.* 80 (2008) 8239-8245.
- [Loaiza, 2009] Loaiza, O. A.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; García, P.; Pingarrón, J. M. *Analyst* 134 (2009) 34-37.
- [Lu, 1996] Lu, B.; Smith, M. R.; O'Kennedy, R. *Analyst* 121 (1996) 29-32.
- [Lu, 2006] Lu, Y.; Yu, J. *Curr. Opin. Biotech.* 17 (2006) 580-588.
- [Lucarelli, 2004] Lucarelli, F.; Marrazza, G.; Turner, A. P. F.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 515-530.
- [Lucarelli, 2008] Lucarelli, F.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Marrazza, G.; Mascini, M. *Anal. Chim. Acta* 609 (2008) 139-159.
- [Maalouf, 2008] Maalouf, R.; Hassen, W. M.; Fournier-Wirth, C.; Coste, J.; Jaffrezic-Renault, N. *Microchim. Acta* 163 (2008) 157-161.
- [Macy, 1997] Macy, E. M.; Hayes, T. E.; Tracy, R. P. *Clin. Chem.* 43 (1997) 52-58.
- [Madigan, 2004] Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. Brock. *Biología de los microorganismos*, Ed. Pearson Educación, S. A., Madrid (2004) 732-733.
- [Majumdar, 2013] Majumdar, T.; Chakraborty, R.; Raychaudhuri, U. *Food Bioscience* 4 (2013) 38-45.
- [Maňásková, 2013] Maňásková, S. H.; Bikker, F. J.; Veerman, E. C. I.; van Belkum, A.; van Wamel, W. J. B. *J. Immunol Methods* 397 (2013) 18-27.

- [Mani, 2009] Mani, V.; Chikkaveeraiah, B. V.; Patel, V.; Gutkind, J. S.; Rusling, J. F. *ACS Nano* 3 (2009) 585-594.
- [Mao, 2008] Mao, X.; Liu, G.; Wang, S.; Lin, Y.; Zhang, A.; Zhang, L.; Ma, Y. *Electrochem. Commun.* 10 (2008) 1847-1850.
- [Mao, 2011] Mao, L.; Yuan, R.; Chai, Y. Q.; Zhuo, Y.; Xiang, Y. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 4204-4208.
- [Marcovina, 2003] Marcovina, S. M.; Koschinsky, M. L.; Albers, J. J.; Skarlatos, S. *Clin Chem.* 49 (2003) 1785-1796.
- [Makaraviciute, 2013] Makaraviciute, A.; Ramanaviciene, A. *Biosens. Bioelectron.* 50 (2013) 460-471.
- [Marks, 2000] Marks, R. S.; Margalit, A.; Bychenko, A.; Bassis, E.; Porat, N.; Dagan, P.; *Appl. Biotech. Biochem.* 89 (2000) 117-126.
- [Martín-Ventura, 2009] Martín-Ventura, J. L.; Blanco-Colio, L. M.; Tunon, J.; Muñoz-García, B.; Madrigal-Matute, J.; Moreno, J. A.; Vega de Ceniga, M.; Egido, J. *Revista Española de Cardiología* 62 (2009) 677-688.
- [Martínez-Paredes, 2010] Martínez-Paredes, G.; González-García, M. B.; Costa-García, A. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 149 (2010) 329-335.
- [Mascini, 2008] Mascini, M.; Tombelli, S. *Biomarkers* 13 (2008) 637-657.
- [Mattos, 2013] Mattos, A. B.; Freitas, T. A.; Kubota, L. T.; Dutra, R. F. *Biochem. Eng. J.* 71 (2013) 97-104.
- [McDonnell, 2009] McDonnell, B.; Hearty, S. Leonard, P.; O’Kennedy, R. *Clin. Biochem.* 42 (2009) 549-561.
- [Melanson, 2007] Melanson, S. E. F.; Tanasijevic, M. J.; Jarolim, P. *Circulation* 116 (2007) 501-504.
- [Mendes, 2012] Mendes, R. K.; Laschi, S.; Stach-Machado, D. R.; Kubota, L. T.; Marrazza, G. *Sens. Act. B.* 166-167 (2012) 135-140.
- [Mirhabibollahi, 1990] Mirhabibollahi, B.; Brooks, J. L.; Kroll, R. G. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34 (1990) 242-247.
- [Mitchell, 2000] Mitchell, T. J. *Res. Microbiol.* 151 (2000) 413-419.
- [Mohammed, 2011] Mohammed, M. I.; Desmulliez, M. P. Y. *Lab Chip* 11 (2011) 569-595.

[Moreira, 2011] Moreira, F. T. C.; Dutra, R. A. F.; Noronha, J. P. O.; Cunha, A. L.; Sales, M. G. F. *Biosens. Bioelectron.* 28 (2011) 243-250.

[Moreno-Guzmán, 2010] Moreno-Guzmán, M.; Eguílaz, M.; Campuzano, S.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Analyst* 135 (2010) 1926-1933.

[Movitz, 1976] Movitz, J. *Eur. J. Biochem.* 68 (1976) 291-299.

[Mulchandani, 2005] Mulchandani, P.; Hangarter, C. M.; Lei, Y.; Chen, W.; Mulchandani, A. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 523-527.

[Němcová, 2010] Němcová, K.; Havran, L.; Šebest, P.; Brázdová, M.; Pivoňková, H.; Fojta, M. *Anal. Chim. Acta* 668 (2010) 166-170.

[Nordestgaard, 2010] Nordestgaard, B. G.; Chapman, M. J.; Ray, K.; Borén, J.; Andreotti, F.; Watts, G. F.; Ginsberg, H.; Amarenco, P.; Catapano, A.; Descamps, O. S.; Fisher, E.; Kovanen, P. T.; Kuivenhoven, J. A.; Lesnik, P.; Masana, L.; Reiner, Z.; Taskinen, M-R.; Tokgözoğlu, L.; Tybjaerg-Hansen, A. *Eur. Heart J.* (2010) 1-12.

[Ojeda, 2012] Ojeda, I.; López-Montero, J.; Moreno-Guzmán, M.; Janegitz, B. C.; González-Cortés, A.; Yáñez-Sedeño, P.; Pingarrón, J. M. *Anal. Chim. Acta* 743 (2012) 117-124.

[Ordeig, 2006] Ordeig, O.; Banks, C. E.; Davies, T. J.; del Campo, J.; Mas, R.; Muñoz, F. X.; Compton, R. G. *Analyst* 131 (2006) 440-445.

[Ordóñez, 1999] Ordóñez, Martín, J. S.; Bonet, R.; Castellví, A. *Roche Diagnostics informa*, Junio (1999) 5-9.

[Ou, 2007] Ou, C.; Yuan, R.; Chai, Y.; Tang, M.; Chai, R.; He, X. *Anal. Chim. Acta* 603 (2007) 205-213.

[Paleček, 2002] Paleček, E.; Fojta, M.; Jelen, F. *Bioelectrochem.* 56 (2002) 85-90.

[Paleček, 2007] Paleček, E.; Fojta, M. *Talanta* 74 (2007) 276-290.

[Pedrero, 2012] Pedrero, M.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M. *Electroanal.* 24 (2012) 470-482.

[Pingarrón, 1999] Pingarrón, J. M.; Sánchez, P. "Química Electroanalítica: fundamentos y aplicaciones". Ed. Síntesis S.A., Madrid (1999).

[Piras, 2005] Piras, L.; Reho, S. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 111 (2005) 450-454.

- [Qi, 2012] Qi, X.; Gao, H.; Zhang, Y.; Wang, X.; Chen, Y.; Sun, W. *Bioelectrochemistry* 88 (2012) 42-47.
- [Qureshi, 2010] Qureshi, A.; Niazi, J. H.; Kallempudi, S.; Gurbuz, Y. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2318-2323.
- [Qureshi, 2012] Qureshi, A.; Gurbuz, Y.; Niazi, J. H. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 171-172 (2012) 62-76.
- [Rai, 2004] Rai, G. P.; Zachariah, K.; Sharma, R.; Phadake, S.; Belapurkar, K. M. *Comp. Immunol. Microb.* 27 (2004) 217-223.
- [Ricci, 2012] Ricci, F.; Adornetto, G.; Palleschi, G. *Electrochim. Acta* 84 (2012) 74-83.
- [Richards, 1968] Richards, F. M.; Knowles, J. R. *J. Mol. Biol.* 37 (1968) 231-233.
- [Rishpon, 1997] Rishpon, J.; Ivnitski, D. *Biosens. Bioelectron.* 12 (1997) 195-204.
- [Roberts, 2000] Roberts, W. L.; Sedrick, R.; Moulton, L.; Spencer, A.; Rifai, N. *Clin. Chem.* 46 (2000) 461-468.
- [Roberts, 2001] Roberts, W. L.; Moulton, L.; Law, T. C.; Farrow, G.; Cooper-Anderson, M.; Savory, J.; Rifai, N. *Clin. Chem.* 47 (2001) 418-425.
- [Romanazzo, 2010] Romanazzo, D.; Ricci, F.; Volpe, G.; Elliott, C. T.; Vesco, S.; Kroeger, K.; Moscone, D.; Stroka, J.; Egmond, H. V.; Vehniainen, M.; Palleschi, G. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2615-2621.
- [Ronkainen-Matsuno, 2002] Ronkainen-Matsuno, N. J.; Thomas, J. H.; Hallsal, H. B.; Heineman, W. R. *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 213-225.
- [Rusling, 2009] Rusling, J. F.; Sotzing, G.; Papadimitrakopoulou, F. *Bioelectrochem.* 76 (2009) 189-194.
- [Sánchez, 2005] Sánchez, R. D.; Zysler, R. D. "Magnetismo de sistemas nanoscópicos, algunas aplicaciones", *Ciencia Hoy (en línea)* 15 (85) (2005).
<http://fisica.cab.cnea.gov.ar/resonancias/Sanchez-Zysler.pdf>
- [Sánchez-Puelles, 1992] Sánchez-Puelles, J. M.; Sanz, J. M.; García, J. L.; García, E. *Eur. J. Biochem.* 203 (1992) 153-159.
- [Scheler, 2012] Scheler, O.; Kindt, J. T.; Qavi, A. J.; Kaplinski, L.; Glynn, B.; Barry, T.; Kurg, A.; Bailey, R. C. *Biosens. Bioelectron.* 36 (2012) 56-61.

- [Selvaraju, 2008] Selvaraju, T.; Das, J.; Han, S. W.; Yang, H. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2008) 932-938.
- [Serra, 2008] Serra, B.; Zhang, J.; Morales, M.D.; Guzmán-Vázquez de Prada, A.; Reviejo, A. J.; Pingarrón, J. M.; *Talanta* 75 (2008) 1134-1139.
- [Settingington, 2012] Settingington, E. B.; Alocilja, E. C. *Biosensors* 2 (2012) 15-31.
- [Sharma, 2006] Sharma, M. K.; Goel, A. K.; Singh, L.; Rao, V. K. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22 (2006) 1155-1159.
- [Silva, 2010] Silva, B. V. M.; Cavalcanti, I. T.; Mattos, A. B.; Moura, P.; Sotomayor, M. P. T.; Dutra, R. F. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1062-1067.
- [Silva, 2013] Silva, B. V. M.; Cavalcanti, I. T.; Silva, M. M. S.; Dutra, R. F. *Talanta* 117 (2013) 431-437.
- [Song, 2012] Song, W.; Pasco, N.; Gooneratne, R.; Weld, R. J. *Biosens. Bioelectron.* 35 (2012) 69-74.
- [Spika, 1981] Spika, J. S.; Verbrugh, H. A.; Verhoef, J. *Infect. Immun.* 34 (1981) 455-460.
- [Steel, 1998] Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Anal. Chem.* 70 (1998) 4670-4677.
- [Stanciu, 2009] Stanciu, L.; Won, Y. H.; Ganesana, M.; Andreescu, S. *Sensors* 9 (2009) 2976-2999.
- [Storri, 1998] Storri, S.; Santoni, T.; Minunni, M.; Mascini, M. *Biosens. Bioelectron.* 13 (1998) 347-357.
- [Sun, 2012] Sun, X.; Cao, Y.; Gong, Z.; Wang, X.; Zhang, Y.; Gao, J. *Sensors* 12 (2012) 17247-17261.
- [Sung, 2013] Sung, Y. J.; Suk, H.-J.; Sung, H. Y.; Li, T.; Poo, H.; Kim, M.-G. *Biosens. Bioelectron.* 43 (2013) 432-439.
- [Tan, 2011] Tan, F.; Leung, P. H. M.; Liu, Z. B.; Zhang, Y.; Xiao, L. D.; Ye, W. W.; Zhang, X.; Yi, L.; Yang, M. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 159 (2011) 328-335.
- [Tawil, 2012] Tawil, N.; Sacher, E.; Mandeville, R.; Meunier, M. *Biosens. Bioelectron.* 37(2012) 24-29.
- [Taylor, 2005] Taylor, A. D.; Yu, Q.; Chen, S.; Homola, J.; Jiang, S. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 107 (2005) 202-208.
- [Tedeschi, 2003] Tedeschi, L.; Domenici, C.; Ahluwalia, A.; Baldini, F.; Mencaglia, A. *Biosens. Bioelectron.* 19 (2003) 85-93.

- [Teles, 2008] Teles, F. R. R.; Fonseca, L. P. *Talanta* 77 (2008) 606-623.
- [Thevenot, 2001] Thevenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. *Biosens. Bioelectron.* 16 (2001) 121- 31.
- [Tombelli, 2000] Tombelli, S.; Mascini, M. *Anal. Lett.* 33 (2000) 2129-2151.
- [Torres, 1998] Torres, M. B.; Álvarez, F. H.; Rodríguez Hernández, A.; Sorell-Gómez, L.; Cabalé, M. B. *Rev. Cubana Cardiol. Cir. Cardiovasc.* 24 (1998) 29-35.
- [Troughton, 2009] Troughton, R. W.; Richards, A. M. *JACC: Cardiovascular Imaging* 2 (2009) 216-225.
- [Tsimikas, 2012] Tsimikas, S.; Hall, J. L. *J. Am. Coll. Cardiol.* 60 (2012) 716-721.
- [Vallina-García, 2007] Vallina-García, R.; García-Suárez, M. M.; Fernández-Abedul, M. T.; Méndez, F. J.; Costa-García, A. *Biosens. Bioelectron.* 23 (2007) 210-217.
- [van der Voort, 2005] van der Voort, D.; McNeil, C. A.; Renneberg, R.; Korfd, J.; Hermens, W. T.; Glatz, J. F. C. *Sensor Actuat. B-Chem.* 105 (2005) 50-59.
- [Vermeeren, 2011] Vermeeren, V.; Grieten, L.; Vanden Bon, N.; Bijmens, N.; Wenmackers, S.; Janssens, S. D.; Haenen, K.; Wagner, P.; Michiels, L. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 157 (2011) 130-138.
- [Vikholm-Lundin, 2006] Vikholm-Lundin, I.; Albers, W. M. *Biosens. Bioelectron.* 21 (2006) 1141-1148.
- [Viswanathan, 2012] Viswanathan, S.; Rani, C.; Delerue-Matos, C. *Anal. Chim. Acta* 726 (2012) 79-84.
- [Vollhardt, 1992] Vollhardt, K. P. C. *"Química Orgánica". Ed. Omega, Barcelona (1992).*
- [Walldius, 2004] Walldius, G.; Jungner, I. *J. Intern. Med.* 255 (2004) 188-205.
- [Wang, 2001] Wang, J.; Kawde, A-N.; Erdem, A.; Salazar, M. *Analyst* 126 (2001) 2020-2024.
- [Wang, 2002] Wang, J.; Kawde, A-N.; Musameh, M.; Rivas, G. *Analyst* 127 (2002) 1279-1282.
- [Wang, 2006] Wang, Z. H.; Viana, A. S.; Jin, G.; Abrantes, L. M. *Bioelectrochem.* 69 (2006) 180-186.
- [Wang, 2007] Wang, J.; Zhang, C.; Gong, J.; Zhu, Y.; Fu, L.; Wang, X.; Li, K. *Clin. Chim. Acta* 385 (2007) 73-78.

- [Wang, 2010^a] Wang, S-M.; Su, W-Y.; Cheng, S-H. *Int. J. Electrochem. Sci.* 5 (2010) 1649-1664.
- [Wang, 2010^b] Wang, J-J.; Han, A-Z.; Meng, Y.; Gong, J-B.; Zhang, C-N.; Li, K.; Liu, Y-X. *Clin. Biochem.* 43 (2010) 571-575.
- [Wang, 2014] Wang, L.; Li, P.; Zhang, Z.; Chen, Q.; Aguilar, Z. P.; Xu, H.; Yang, L.; Xu, F.; Lai, W.; Xiong, Y.; Wei, H. *Food Control* 36 (2014) 119-125.
- [Warsinke, 2000] Warsinke, A.; Benkert, A.; Scheller, F. W. *Fresen. J. Anal. Chem.* 366 (2000) 622-634.
- [Watson, 1953] Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature*. 171 (1953) 737-738.
- [Wesolowski, 2009] Wesolowski, J.; Alzogaray, V.; Reyelt, J.; Unger, U.; Juarez, K.; Urrutia, M.; Cauerh, A.; Danquah, W.; Rissiek, B.; Scheuplein, F.; Schwarz, N.; Adriouch, S.; Boyer, O.; Seman, M.; Licea, A.; Serreze, D. V.; Goldbaum, F. A.; Haag, F.; Koch-Nolte, F. *Med. Microbiol. Immunol.* 198 (2009) 157-174.
- [Wiriyaichaiorn, 2013] Wiriyaichaiorn, S.; Howarth, P. H.; Bruce, K. D.; Dailey, L. A. *Diagn. Microb. Infect. Dis.* 75 (2013) 28-36.
- [Wolf, 2004] Wolf, M.; Juncker, D.; Michel, B.; Hunziker, P.; Delamarche, E. *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1193-1202.
- [Wu, 2008] Wu, A. H.; Jaffe, A. S. *Am. Heart J.* 155 (2008) 208-214.
- [Wu, 2009] Wu, Y.; Zheng, J.; Li, Z.; Zhao, Y.; Zhang, Y. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 1389-1393.
- [Wu, 2011] Wu, G.; Yang, N.; Zhang, T.; Wang, Z.; Lu, X.; Kang, J. *Sensor Actuat. B-Chem.* 160 (2011) 598-603.
- [Yang, 2006] Yang, Z.; Zhou, D. M. *Clin. Biochem.* 39 (2006) 771-780.
- [Yang, 2009^a] Yang, G.; Chang, Y.; Yang, H.; Tan, L.; Wu, Z.; Lu, X.; Yang, Y. *Anal. Chim. Acta* 644 (2009) 72-77.
- [Yang, 2009^b] Yang, Y. N.; Lin, H. I.; Wang, J. H.; Shiesh, S. C.; Lee, G. B. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 3091-3096.
- [Yang, 2013] Yang, Y.; Zhou, J.; Zhang, Y.; Zou, Q.; Zhang, X.; Chen, J. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 182 (2013) 504-509.
- [Yao, 2008] Yao, K-H.; Yang, Y-H. *Vaccine* 26 (2008) 4425-4433.

- [Yi, 2011] Yi, W.; Liang, W.; Li, P.; Li, S.; Zhang, Z.; Yang, M.; Chen, A.; Zhang, D.; Hu, C.; *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 1539-1543.
- [Yuanyuan, 2006] Yuanyuan, X.; Shanhong, X.; Chao, B.; Shaofeng, C. *Ser. F- Info. Sci.* 49 (2006) 397-408.
- [Zacco, 2007] Zacco, E.; Adrian, J.; Galve, R.; Marco, M. P.; Alegret, S.; Pividori, M. I. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2184-2191.
- [Zatta, 1996] Zatta, P. F. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 32 (1996) 7-13.
- [Zelada-Guillén, 2012] Zelada-Guillén, G. A.; Sebastián-Avila, J. L.; Blondeau, P.; Riu, J.; Rius, F. X. *Biosens. Bioelectron.* 31 (2012) 226-232.
- [Zhang, 2009] Zhang, X.; Geng, P.; Liu, H.; Teng, Y.; Liu, Y.; Wang, Q.; Zhang, W.; Jin, L.; Jiang, L. *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2155-2159.
- [Zhang, 2011] Zhang, G. J.; Luo, Z. H. H.; Huang, M. J.; Ang, J. J.; Kang, T. G.; Ji, H. *Biosens. Bioelectron.* 28 (2011) 459-463.
- [Zhang, 2012] Zhang, G. J.; Chai, K. T. C.; Luo, H. Z. H.; Huang, J. M.; Tay, I. G. K.; Lim, A. E. J.; Je, M. *Biosens. Bioelectron.* 35 (2012) 218-223.
- [Zhao, 2010] Zhao, G. Zhan, X. *Electrochim. Acta* 55 (2010) 2466-2470.
- [Zhong, 2010] Zhong, Z.; Wu, W.; Wang, D.; Wang, D.; Shan, J.; Qing, Y.; Zhang, Z. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2379-2383.
- [Zhou, 2010] Zhou, F.; Lu, M.; Wang, W.; Bian, Z-P.; Zhang, J-R.; Zhu, J-J. *Clin.Chem.* 56 (2010) 1701-1707.
- [Zhu, 2010] Zhu, X.; Duana, D.; Publicover, N. G. *Analyst* 135 (2010) 381-389.
- [Zhuang, 2013] Zhuang, J.; Fu, L.; Xu, M.; Zhou, Q.; Chen, G.; Tang, D. *Biosens. Bioelectron.* 45 (2013) 52-57.
- [Zhuo, 2011] Zhuo, Y.; Yi, W. J.; Lian, W. B.; Yuan, R.; Chai, Y. Q.; Chen, A.; Hu, C. M. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2188-2193.
- [Zhuo, 2014] Zhuo, Y.; Han, J.; Tang, L.; Liao, N.; Guia, G-F.; Chai, Y-Q.; Yuan, R. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 192 (2014) 791-795.

7. RESUMEN EN INGLÉS

Bacteria such as *S. pneumoniae* and *S. aureus* constitute a danger to human health, and nowadays, the accurate identification and rapid diagnosis of the respective bacterial diseases is still a challenge. The ingestion of food contaminated by *S. aureus* or its enterotoxins causes gastroenteritis within a 2–6 h time period. As a consequence, the detection of this bacterium in processed food, particularly in raw and cooked meat, milk and dairy products, which are mainly responsible for its transmission to humans, is very important in clinical diagnosis. On the other hand, *S. pneumoniae* is an important human pathogen that causes meningitis, otitis media, sepsis, and pneumonia. Pneumonia kills an estimated 2 million children under 5 years old and causes 14.5 million cases of serious illness each year, more than HIV/AIDS, measles, and malaria combined. In an era of increasing resistance to antimicrobial agents, accurate identification and rapid diagnosis of pneumococcal infections are critical and may have important implications in the selection of antimicrobial agents for therapy.

Standard microbiological culture tests, traditionally performed to detect and enumerate cfu, although sensitive and specific are time-consuming, require skilled personal and need from 24 to 48 h to provide responses. Consequently, efforts to set up alternative molecular tools relying on the recognition of one of the pathogen components by specific probes or antibodies for immunological assays have been described. Given the interest associated with detecting quickly and unequivocally the presence of low concentrations of these bacteria in food and clinical samples, and taking into account the limitations of the available methodologies, there is an urgent need for developing novel analysis approaches that may offer a more sensitive, specific, and rapid detection.

On the other hand, cardiovascular diseases are the major cause of death among adults worldwide. During recent years, several protein biomarkers have been associated with increased relative risk for cardiovascular events and could potentially add predictive value to establish risk factor sets.

Electrocardiograms, the first test when patients suffer from chest pain, lack of the required sensitivity. Standard assays currently used to detect cardiac biomarkers involve ELISA, RIA, immunochromatographic tests, ECL immunoassays and SPR. Although these methodologies are characterized by their selectivity, they also lack stability, imply long analysis times and high costs, and they are not portable, also demanding skilled professionals and expensive instrumentation.

When considering the implementation of new sensing methodologies, MBs stand out because of their ability to facilitate efficient antigen retrieval and concentration, reduce largely the assay time and favor analytical procedures more applicable to higher sample throughput and automation. Their use has also been considered a methodological approach that enhances sensitivity and reduces detection time in electrochemical biosensors performance, and moreover, allows the separation of steps related to the affinity reaction from those concerning the electrochemical detection, thus facilitating the transduction of the event. In addition, the use of SPEs as electrochemical transducers, allows the mass production of very reproducible disposable and low cost sensors. Furthermore disposable biosensors do not suffer permanent contamination, and their use prevent response loss problems because of the accumulation of impurities and proteolysis reactions, features specially relevant in the work with complex matrices like food and clinical samples.

Given the importance of the determination of the mentioned analytes, in this work several disposable electrochemical biosensors for the individual and multiplexed determination of different bacteria, virulence factors and cardiac biomarkers in food and clinical samples have been described, which may be applied as rapid methods for on-site analysis. For the development of these biosensors, selective bioreceptors, appropriate affinity assays formats and innovative designs have been implemented, resulting in methods with outstanding analytical characteristics, which can be competitive with other classical analytical procedures. The developed biosensors were:

a) A disposable amperometric magnetoimmunosensor and an electrochemical magneto-immuno-PCR approach for the rapid, specific, direct and highly sensitive

detection of *S. pneumoniae*, based on the use of functionalized magnetic beads (ProtA-MBs and Strp-MBs) and specific antibodies and capture probes. A sandwich format was employed in the implementation of the magnetoimmunosensor, where ProtA-MBs were used as a solid phase to immobilize specific *S. pneumoniae* capture antibodies, and the same antibodies but conjugated to HRP were employed as detector antibodies. The sensitivity of the determination was improved with the electrochemical magneto-immuno-PCR approach by applying a daPCR strategy (used to amplify a characteristic 235-bp region of the gene coding for the major pneumococcal autolysin, *lytA*) using as PCR template the bacteria attached to the specific capture antibody modified-MBs. The predominantly single-stranded and biotinylated amplicon generated was subsequently hybridized onto Strp-MBs modified with a specific biotinylated 20-mer capture probe, and then labeled with a Strp-HRP polymer. In both, the magnetoimmunosensor and the immune-PCR approaches, the electrochemical detection of the enzyme product was performed using SPAuEs modified with TTF (as electron transfer mediator) and H₂O₂ (as the enzyme substrate). A great specificity against other streptococci was observed together with a good reproducibility considering both the disposable nature of the sensors used and the low bacterial cell concentration assayed. The magnetoimmunosensor was applied to the analysis of inoculated urine samples with promising results.

b) A sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of Staphylococcal protein A and *S. aureus*, based on the immobilization of specific antibodies onto ProtA-MBs, and a direct competitive immunoassay involving ProtA antigen labelled with HRP. The developed methodology showed a limit of detection three orders of magnitude lower than the maximum allowed level for *S. aureus* in food, and a good selectivity against the most commonly involved foodborne pathogens originating from milk.

c) Three disposable amperometric magnetoimmunosensors for the individual determination of cTnT, NT-proBNP and CRP cardiac biomarkers in human serum samples. The cTnT immunosensor design involves binding of Strp-MBs to a specific biotinylated capture antibody and detection with a HRP-labeled antibody. For NT-

proBNP and CRP determination, an indirect competitive and a sandwich format, respectively, based on the covalent immobilization of the antigen or a specific antibody onto HOOC-MBs activated with the EDC/sulfo-NHS system, and HRP-labeled tracers were employed. In all cases, the resulting modified-MBs were magnetically captured on the surface of a disposable SPAuE and the amperometric response obtained at an applied potential of -0.10 V vs the Ag pseudoreference electrode upon addition of TMB-H₂O₂ was used to monitor the affinity reaction.

d) A multiplexed magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of NT-proBNP and CRP cardiac biomarkers in human serum, based on the use of SPdCEs, HOOC-MBs and indirect competitive and sandwich assay configurations, respectively. The dual magnetoimmunosensor exhibited excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity and a wide range of quantifiable antigen concentrations.

e) An integrated amperometric immunosensor for Lp(a) determination in human serum, based on a sandwich immunoassay format, and on an innovative design involving SPCEs modified with a dense layer of a commercial long alkyl chain HS-NTA ligand as novel scaffolds for the covalent immobilization of the capture antibodies.

f) Finally, an integrated DNA voltammetric sensor to study the determinants of the limit of detection and the specificity of surface-based biosensors.

The developed electrochemical biosensors and implemented methodologies have proven to be useful and promising analytical tools for the detection and determination of specific bacteria and cardiac biomarkers. The presented results demonstrate the reliability, accuracy, speed, and selectivity of the developed methodologies for the specific antigen detection in food and clinical samples. Also, the simplicity and the easy automation and miniaturization of the employed instrumentation, make them useful, promising and attractive analytical tools for the development of portable devices for onsite analysis.

8. PUBLICACIONES/ PUBLISHED PAPERS

Disposable amperometric magnetoimmunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*

Campuzano, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Yuste, J.;
Pedrero, M.; García, J. L.; García, P.; García, E.;
Pingarrón, J. M.



Vol. 26 p. 1225–1230, 2010



Disposable amperometric magnetoimmunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*

Susana Campuzano^{a,b}, Berta Esteban-Fernández de Ávila^b, José Yuste^{a,c}, María Pedrero^b, José Luis García^a, Pedro García^{a,c}, Ernesto García^{a,c}, José Manuel Pingarrón^{b,*}

^a Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES, initiative of Instituto de Salud Carlos III), Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 April 2010

Received in revised form 24 May 2010

Accepted 7 June 2010

Available online 20 June 2010

Keywords:

S. pneumoniae

Magnetic beads

Immunosensors

Amperometry

Gold screen-printed electrodes

ABSTRACT

Disposable amperometric magnetoimmunosensors, based on the use of functionalized magnetic beads and gold screen-printed electrodes, have been developed for the selective detection and quantification of *Streptococcus pneumoniae*. A specific antibody prepared against a serotype 37 *S. pneumoniae* strain, selected by flow cytometry among seven anticapsular or antisomatic antibodies, was linked to Protein A-modified magnetic beads and incubated with bacteria. The same antibody, conjugated with horseradish peroxidase, was attached to the bacteria and the resulting modified magnetic beads were captured by a magnetic field on the surface of tetrathiafulvalene-modified gold screen-printed electrodes. The amperometric response obtained at -0.15 V vs. the silver pseudoreference electrode of the Au/SPE after the addition of H_2O_2 was used as transduction signal. Different assay formats were examined and the experimental variables optimized. The limits of detection achieved, without pre-concentration or pre-enrichment steps, were 1.5×10^4 cfu mL^{-1} (colony forming unit) and 6.3×10^5 cfu mL^{-1} for *S. pneumoniae* strains Dawn (serotype 37) and R6 (non-encapsulated), respectively. The developed methodology shows a good selectivity against closely related streptococci and its usefulness for the analysis of inoculated urine samples has been demonstrated. The total analysis time of 3.5 h from sampling to measurement, the possibility to prepare up to 30 sensors per day and the use of small amounts of test solution for *S. pneumoniae* identification, constitute important advantages that make the developed methodology a promising alternative for clinical diagnosis.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Streptococcus pneumoniae (pneumococcus) is an important human pathogen that causes meningitis, otitis media, sepsis, and pneumonia. This pathogen, together with *Haemophilus influenzae* type b, is currently the leading cause of bacterial meningitis in children and adults (Editorial, 2009). Pneumonia kills more children under 5 years of age worldwide than any other infectious disease. This disease kills an estimated 2 million children in this age group and causes 14.5 million cases of serious illness each year, more than HIV/AIDS, measles, and malaria combined. In an era of increasing resistance to antimicrobial agents, accurate identification and rapid diagnosis of pneumococcal infections are critical and may have

important implications in the selection of antimicrobial agents for therapy (Dowell et al., 2001).

The golden standard procedure for establishing an etiological diagnosis includes Gram stain and culture of blood, sputum or cerebrospinal fluid (CSF) samples. The Gram stain examination is rapid but scarcely sensitive ($>10^5$ bacteria mL^{-1}) and culture takes 24–48 h and is sometimes compromised by spontaneous autolysis or antibiotic treatment (Stuertz et al., 1998; Rai et al., 2004; Roupael et al., 2008). Alternatives to these methods are direct pneumococcal antigen detection in body fluids by latex agglutination, co-agglutination, counter immunoelectrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (García-Suárez et al., 2007, 2009), DNA probes, polymerase chain reaction methods (Corless et al., 2001; Stralin et al., 2006; Harris et al., 2008), and several pneumococcal antigen tests (Stuertz et al., 1998; Samra et al., 2003; Ehara et al., 2008; Rai et al., 2004). An immunochromatographic membrane assay, Binax NOW *S. pneumoniae* Urinary Antigen Test (Inverness Medical International, Cranfield, UK), detects the C polysaccharide cell wall antigen common to all *S. pneumoniae* isolates. This test is commercially available, rapid (≈ 15 min), easy-to-use and was approved by the US Food and Drug

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4315; fax: +34 91 394 4329.

E-mail addresses: susanacr@quim.ucm.es (S. Campuzano), berta.efa@quim.ucm.es (B.E.-F. de Ávila), jyuste@cib.csic.es (J. Yuste), mpedrero@quim.ucm.es (M. Pedrero), jlgarcia@cib.csic.es (J.L. García), pgarcia@cib.csic.es (P. García), egarcia@cib.csic.es (E. García), pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).

Administration (FDA) for use in the United States (Dowell et al., 2001; Samra et al., 2003). The efficiency of this technique does not depend on treatment with antibiotics (Andreo et al., 2006; Lasocki et al., 2006) and it has demonstrated to be accurate for direct urine and CSF testing. However, it has a low sensitivity (the manufacturer specifies a detection limit of about 10^5 cfu mL⁻¹ in CSF (Gisselsson-Solén et al., 2007)), a poor selectivity towards other streptococci (*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* and other α -hemolytic streptococci), and various pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* and *H. influenzae*) including *Escherichia coli* (Navarro et al., 2004; Moore et al., 2004; Lasocki et al., 2006; Gisselsson-Solén et al., 2007). Furthermore, this test fails to distinguish infants and children (which are more likely to be asymptomatic carriers of pneumococci than adults) with pneumococcal pneumonia from those who are merely colonized (Dowell et al., 2001; Samra et al., 2003; Navarro et al., 2004; Andreo et al., 2006). Also, it is associated with a lack of detection immediately after the onset of infection, and with long-term antigen-positive results regardless of treatment (1–3 months) or if the patient has been vaccinated with a pneumococcal conjugate vaccine shortly before the test (Ehara et al., 2008). Given the foremost interest associated with detecting quickly and unequivocally the presence of low concentrations of *S. pneumoniae* in clinical samples and the limitations of the available methodologies, there is an urgent need for developing novel diagnostic approaches that may offer a more sensitive, specific, and rapid detection of *S. pneumoniae*.

An alternative approach is the use of electrochemical immunosensors which combine the high selectivity provided by immunological species with the high sensitivity achieved with modern electrochemical techniques (Zacco et al., 2006). Recently, improvements in immunosensor performance, including enhanced sensitivity and reduced detection time, were attributed to the use of magnetic beads (MBs) (Nam et al., 2003; Bange et al., 2005; Rosi and Mirkin, 2005; Marquette and Blum, 2006; Zhang et al., 2006; Willner et al., 2007). MBs allow easy separation and localization of target analytes by an external magnet, fast immunoreactions between antigen and antibody, and low nonspecific binding by surface modification (Richardson et al., 2001; Matsunaga and Okamura, 2002; Zacco et al., 2006; Hsing et al., 2007; Selvaraju et al., 2008; Barletta et al., 2009). These approaches separate the steps related to the immunoreaction from the one concerning the electrochemical detection, which facilitates the transduction of the affinity event (Centi et al., 2007).

This paper describes, for the first time, the development of disposable electrochemical magnetoimmunosensors for *S. pneumoniae* analysis as a rapid and sensitive method for future deployment for on-site diagnosis. A sandwich format was employed, where Protein A-coated MBs were used as a solid phase to immobilized, specific *S. pneumoniae* capture antibodies. The same antibody conjugated to an enzyme label, horseradish peroxidase (HRP), was employed as the detection antibody recognizing the captured *S. pneumoniae* cells. The electrochemical detection of the enzyme product was performed at a disposable gold screen-printed electrode (Au/SPE), using tetrathiafulvalene (TTF) as electron transfer mediator and H₂O₂ as the enzyme substrate. The immunosensor performance, including the selectivity against other streptococci, was evaluated, and the disposable magnetoimmunosensors were applied to the analysis of inoculated urine samples.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and electrodes

Amperometric measurements were carried out with an ECO Chemie Autolab PSTAT 10 potentiostat using the software package

GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System). A P-Selecta (Scharlab) ultrasonic bath, an autoclave (Raypa AES-75), a horizontal laminar flow Hood/Cabin Telstar mod. AH-100, an Optic Ivymen® System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A.), a P-Selecta Agimatic magnetic stirrer, and a flow cytometer FC500 from Beckman Coulter, equipped with a 488 nm Ar-ion laser, were also used. Data were analyzed with FlowJo 7.2.2 (Tree Star Inc.). Au/SPEs (220AT, 4-mm \varnothing , Au/SPEs) purchased from Dropsens were used. These screen-printed electrodes include a silver pseudoreference electrode and a gold counter electrode. A neodymium magnet (AIMAN GZ) was used to control the attraction of the modified MBs to the modified Au/SPE surfaces. Magnetic separation during the washing steps was performed using a DynaMag-2 (DynaL Biotech ASA) magnetic separator.

2.2. Reagents and solutions

Protein A-modified MBs (30 mg mL⁻¹) (Dynabeads® Protein A), were purchased from Dynal Biotech ASA; streptavidin-peroxidase polymer (ultrasensitive; streptavidin-HRP), and hydrogen peroxide were purchased from Sigma and used as received. Stock solutions of streptavidin-HRP (10 μ g mL⁻¹) were prepared in 10 mM sodium phosphate buffer solution (pH 7.4) containing 138 mM NaCl (Scharlau), 2.7 mM KCl (Scharlau), and 0.05% (w/v) Tween 20 (Aldrich). Stock 0.1 M H₂O₂ solutions were prepared in a 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0).

The bacteria strains employed in this study (*S. pneumoniae* R6 (nonencapsulated), *S. pneumoniae* TIGR4 (serotype 4), *S. pneumoniae* Dawn (serotype 37), the type strains of *Streptococcus pseudopneumoniae* (CCUG 44455), *S. mitis* (NCTC 12261), *S. oralis* (NCTC 11427), *Streptococcus sanguinis* CECT 480, and *Streptococcus constellatus* NCTC 10708, and *E. coli* DH5 α) and their growth conditions are described in the [supplementary information](#).

The polyclonal antibodies assayed were: ab20429 (Abcam), PA1-7259 (Pierce), both recognize serotypes/serogroups 3, 4, 6, 7, 9, 14, 18, 19, and 23 of *S. pneumoniae*, anti-S37 (obtained in our lab; immunogen: whole cells of *S. pneumoniae* serotype 37), and anti-R (obtained in our lab; immunogen: whole cells of *S. pneumoniae* R6). Anti-PLY (monoclonal antipneumolysin antibody) was kindly provided by F. J. Méndez (Universidad de Oviedo, Spain) (de los Toyos et al., 1996); anti-TEPC 15 (Sigma; specificity towards phosphoryl choline) and anti-C-LytA (immunogen: C-terminal domain of the protein LytA) (Sánchez-Puelles et al., 1992) were also used. Flow cytometry experiments for the antibody selection are described in the [supplementary information](#). Also, details on the production of rabbit antisera and on the purification of the IgGs can be found in the [supplementary information](#).

Other solutions employed, prepared in deionized water, were: B&W buffer, consisting of 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.01% Tween 20, pH 8.2; PBS (pH 6.8) containing 0.01% Tween 20; a 0.5 M H₂SO₄ (Scharlau) solution containing 10 mM KCl and a 0.5 M TTF (Aldrich) solution prepared in acetone (Scharlau). All chemicals used were of analytical-reagent grade, and deionized water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system (18.2 M Ω cm).

2.3. Pretreatment of Au/SPEs

Fifty microliters of a 0.5 M H₂SO₄ solution containing 10 mM KCl was deposited onto the surface of the Au/SPEs and the potential was cycled ten times between 0.0 and +1.25 V at a scan rate of 100 mV s⁻¹. The treated electrodes were rinsed with water and dried under a N₂ flow.

2.4. Modification of MBs

A suspension of 10 μL of Protein A-modified MBs was transferred into a 1.5 mL tube. The MBs were washed twice with 100 μL B&W buffer solution to remove the NaN_3 preservative and resuspended in 100 μL of the same buffer containing 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the antibody. The antibody was captured onto the beads during 1 h at 37 °C under continuous stirring (600 rpm). Subsequently, the antibody-modified MBs were washed twice with 100 μL of B&W buffer solution. Each washing step consisted of resuspension of MBs in the washing solution for 2 min, followed by separation with the magnet holding block to remove the supernatant. The antibody-coated MBs were resuspended in 200 μL of PBS buffer (pH 6.8) containing the bacterial suspension. After 60 min of incubation at 37 °C under stirring (600 rpm), the bacteria-antibody-attached MBs were washed twice with 100 μL of B&W buffer solution and then with 100 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0). Thereafter, incubation with the labeled antibody was accomplished by resuspending the modified MBs in 100 μL of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme-conjugated antibody solution prepared in PBS (pH 6.8). The recognition reaction was left to proceed for 60 min at 37 °C with continuous mixing (600 rpm). The labeled antibody–bacteria–antibody/MBs assembly was then washed two times with 100 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0). Finally, the modified MBs were resuspended in 45 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer solution, pH 7.0.

2.5. Deposition of magnetic beads onto the TTF-Au/SPEs

Activated Au/SPEs were modified by placing 5 μL of 0.5 M TTF solution on their surface, and let to dry at room temperature. Modified MBs were captured on the TTF-Au/SPEs surface by placing a neodymium magnet under the electrode surface.

2.6. Amperometric measurements

Amperometric measurements were carried out at room temperature by placing 45 μL of the modified MBs suspension onto the TTF-Au/SPEs surface, covering the three electrodes area. When a background steady-state current was obtained, at an applied potential of -0.15 V vs. a Ag pseudoreference electrode, 5 μL of a 3.5 mM H_2O_2 solution was deposited on the bioelectrode surface and the change in the current recorded. Analytical measurements were performed after 180 s of H_2O_2 addition.

2.7. Urine analysis

Samples of fresh human urine were inoculated with *S. pneumoniae* in concentrations ranging from 5.0×10^4 to 1.0×10^7 cfu mL^{-1} . Aliquots (200 μL) were analyzed following the methodology already described for standard bacterial solutions.

3. Results and discussion

The disposable magnetoimmunosensors developed are based on a sandwich configuration that is schematically displayed in Fig. 1. In brief, capture antibodies were coupled to the Protein A-coated MBs through the strong affinity of Protein A for the Fc part of IgG molecules. Then, the bacteria were captured by a 60-min conjugation step. This step was followed by a further 60-min conjugation of the HRP-labeled antibody to the bacteria-capture antibody-MB conjugate. After each step, MBs were separated from the supernatant by placing the tubes in a magnet separator until MBs migrated to the tube sides and the liquid was clear. To shuttle electrons between the oxidized enzyme and the working electrode,

MBs modified with the immunosensing complex were immobilized on top of a TTF electron mediator-modified Au/SPE by means of a neodymium magnet placed under the electrode surface. The biorecognition event was monitored upon addition of H_2O_2 , which is reduced in the presence of HRP, enzyme regeneration being mediated by TTF. Therefore, the generated TTF^+ was electrochemically reduced at an applied potential more negative than the formal potential of the TTF/ TTF^+ redox couple (Campuzano et al., 2005). Using this protocol, immunoreactions occurred on the surface of MBs and not on the electrode surface, the TTF-Au/SPE acting only as a transducer of the recognition event.

Firstly, the suitability of the proposed assay design was verified by comparing the amperometric responses obtained at an applied potential of -0.15 V (vs. Ag/AgCl) after implementing the protocol in the presence and in the absence of bacteria. The measured current was approximately 5 times higher when the process was performed in the presence of 2.0×10^6 cfu *S. pneumoniae* Dawn strain (data not shown), demonstrating that a much larger amount of HRP-labeled antibody was attached in the presence of bacteria and that the proposed assay was suitable for the electrochemical detection of bacteria–antibody recognition processes.

3.1. Selection of specific antibodies

Purified antibodies for hyperimmune rabbit sera produced were identified as IgG class and did not contain any detectable contaminants. The selectivity of the seven available antibodies was checked by flow cytometry (Fig. 2). Anticapsular antibodies showed a good selectivity against non-pneumococcal streptococci and unrelated bacteria, with the exception of PA1-7259 antibody that showed a high cross-reactivity to *E. coli*. On the contrary, the selectivity towards pneumococcus obtained with the antisomatic antibodies was much worse. Taking into account that anti-S37 produced good signals both to encapsulated and to nonencapsulated *S. pneumoniae* strains and that it exhibited very low responses with other streptococci and *E. coli*, it was selected for further study.

3.2. Optimization of variables and comparison of different assay formats

Optimization of variables for the immunoassay on the MBs was performed. The concentration of capture and detection antibodies, the time elapsed for the different incubation steps and the ratio between the volumes of MBs stock solution and the resuspension solution were evaluated. In all the studies, the specific signals obtained in the presence of 1.0×10^7 cfu mL^{-1} of *S. pneumoniae* Dawn and the nonspecific ones (in the absence of bacteria) were measured. Details on the results obtained in these optimization studies are included in the [supplementary information](#).

Different assay formats were also evaluated. Apart from that depicted in Fig. 1 (format 1), two alternative approaches were checked (Fig. 3a). Format 2 implies incubation of MBs modified with the antibody–bacteria conjugate in a solution of biotinylated antibody, which is marked further with a streptavidin-HRP polymer according to the procedure previously described by our group for DNA sensors (Loaiza et al., 2008). Format 3 makes use of a two-step signal amplification methodology. Biotinylated rabbit anti-streptavidin was added to the first layer of streptavidin-HRP polymer, and the conjugate incubated again with the streptavidin-HRP polymer (Kim et al., 2009). Fig. 3b compares the specific and nonspecific signals obtained for the three formats tested. Although the specific responses obtained with formats 1 and 2 were similar, the signal obtained in the absence of bacteria is notably stronger when using the streptavidin-HRP polymer, which can be attributed to a nonspecific adsorption of the polymer. Quite unexpectedly, the amperometric signals obtained using the two-step amplification

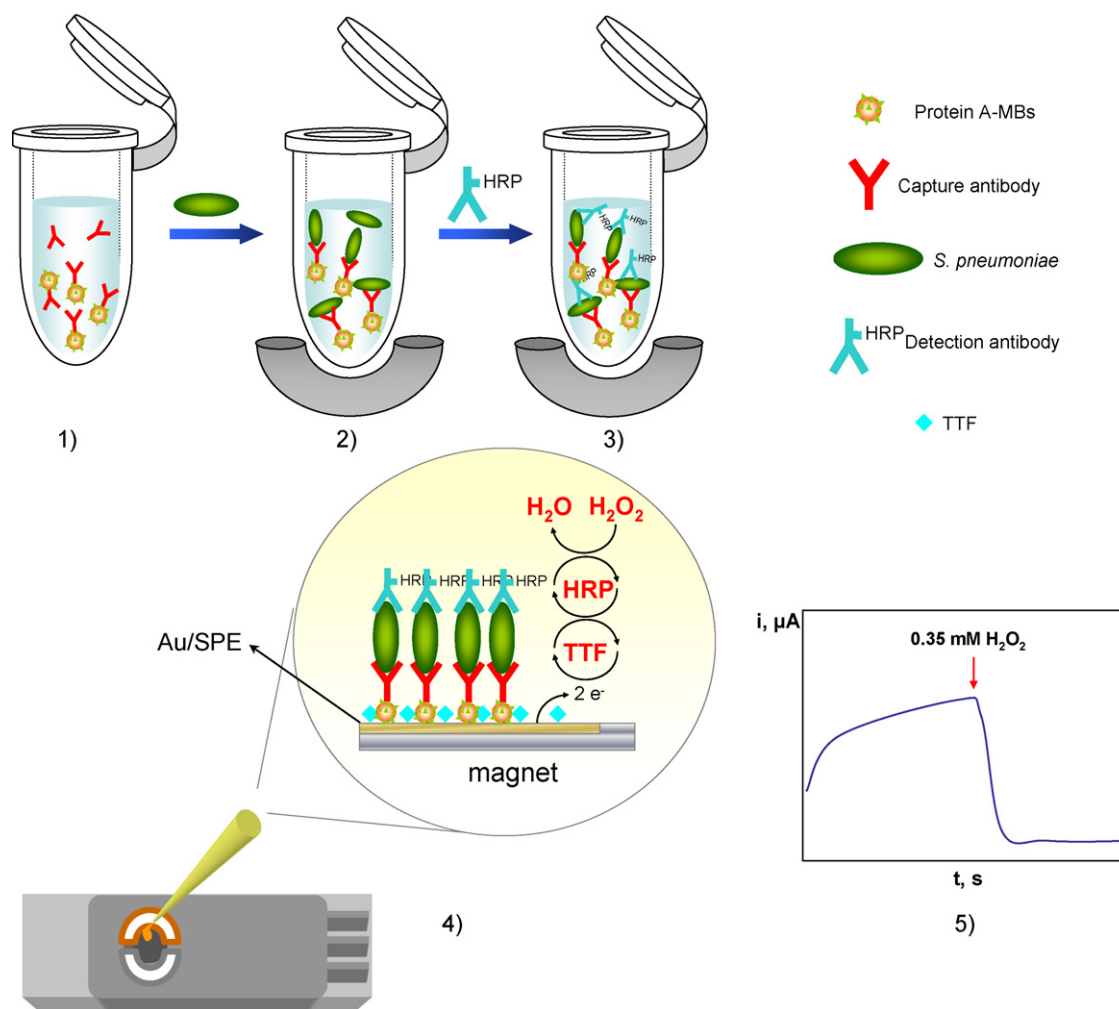


Fig. 1. Schematic representation of the developed methodology: (1) immobilization of capture antibodies on protein A-modified MBs; (2) MB-antibody–bacteria complexes separation and removing excess antibody; (3) incubation with labeled antibody; (4) MBs capture on the TTF-Au/SPEs; (5) amperometric detection of the mediated reduction of H_2O_2 with TTF.

method (format 3) were even weaker than the responses for the format involving a single step (format 2), which was most likely due to the dissociation of the biotinylated anti-streptavidin antibody from the initial streptavidin–HRP layer as a result of the competition with

the second streptavidin–HRP layer (Kim et al., 2009; Anderson and Taitt, 2008). Taking into account all these results as well as the simplicity and rapidity of the immunoassay, the format using the HRP-labeled specific antibody (format 1) was selected to explore the analytical characteristics of the immunosensors.

3.3. Analytical characteristics for *S. pneumoniae* quantification

Firstly, the reproducibility of the assay was evaluated by measuring the responses obtained with 5 different sensors constructed following the same protocol. Sets of measurements were carried out for both the Dawn and the R6 strains. Bacterial concentrations were, respectively, 1.0×10^6 and 1.0×10^7 cfu mL^{-1} , due to the different sensitivities observed for the detection of both strains. Relative standard deviation (RSD) values for the amperometric responses were 11.5% and 6.4%, respectively. These results reflect an acceptable reliability for the immunosensor construction procedure, which is a key factor when working with disposable, modified SPEs, as well as for the effectiveness of the binding between the bacteria and the modified MBs attracted to the TTF-modified SPEs. Calibration curves for both *S. pneumoniae* strains, expressed as a function of the logarithm of the bacterial concentration (in cfu mL^{-1}), were constructed. Concerning the Dawn strain, a linear range ($r = 0.996$) between 4.3×10^4 and 1.0×10^7 cfu mL^{-1} was obtained with a slope value of $(2.7 \pm 1.0) \times 10^{-7}$ A. The R6 strain cal-

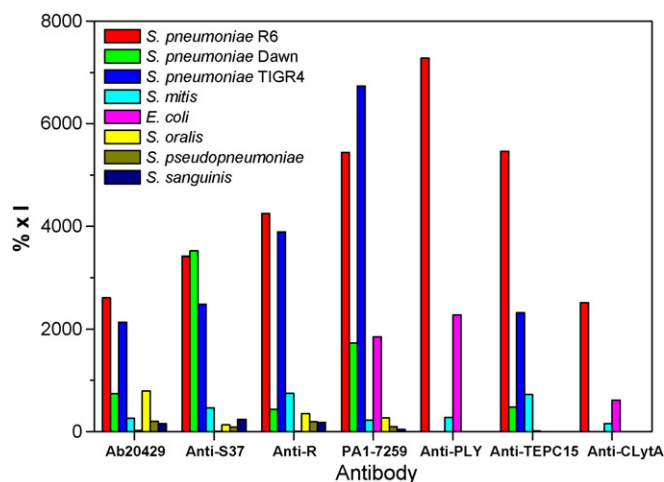


Fig. 2. Product of % positive population by fluorescence intensity obtained with each of the bacteria tested for each antibody.

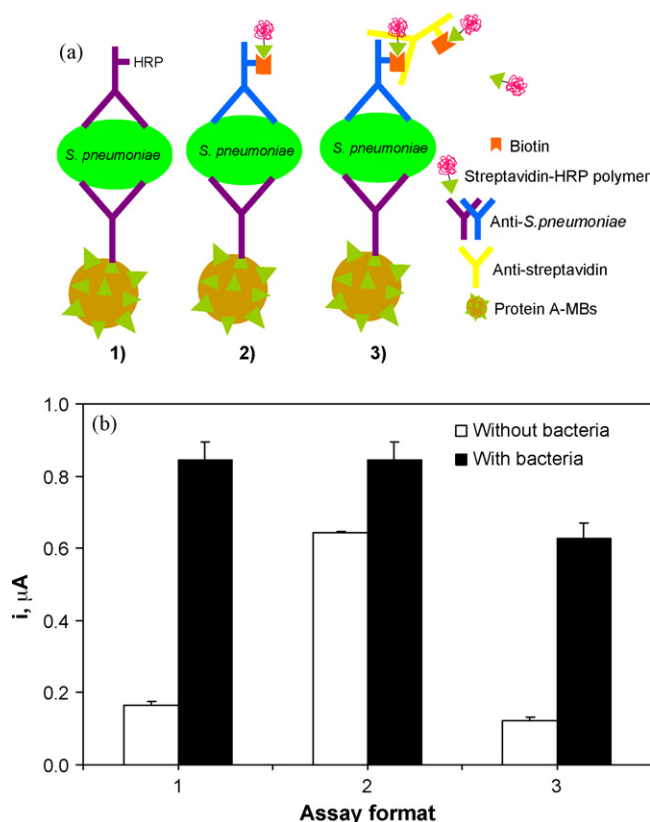


Fig. 3. (a) Schematic representations of the three assay formats tested (b) influence of the assay format on the analytical signal obtained. Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate buffer solution, pH 7.0; $[\text{H}_2\text{O}_2] = 0.35 \text{ mM}$; TTF loading, $2.5 \mu\text{mol}$; Protein A-MBs, $10 \mu\text{L}$ (30 mg mL^{-1}); [capture antibody] = [labeled antibody] = $20 \mu\text{g mL}^{-1}$; [streptavidin-peroxidase polymer] = $1 \mu\text{g}$; $t_{\text{inc}} = 60 \text{ min}$. $E_{\text{app}} = -0.15 \text{ V}$ vs. a Ag pseudoreference electrode. Further experimental details are described in the text. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$).

ibration plot exhibited a linear range ($r = 0.998$) over the 7.5×10^5 to $1.0 \times 10^8 \text{ cfu mL}^{-1}$ range, the slope value being $(2.9 \pm 0.7) \times 10^{-7} \text{ A}$. The limits of detection were calculated according to the $3 \times s_b/m$ criterion, where m is the slope of the linear part of the calibration plot and s_b was estimated as the standard deviation ($n = 10$) of the amperometric signals obtained from different bacterial suspensions at 1.0×10^5 or $1.0 \times 10^6 \text{ cfu mL}^{-1}$ for the Dawn and R6 strains, respectively. The obtained values, $1.5 \times 10^4 \text{ cfu mL}^{-1}$ ($3.0 \times 10^3 \text{ cfu}$) and $6.3 \times 10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$ ($1.3 \times 10^5 \text{ cfu}$), respectively, can be qualified as quite good considering that no pre-concentration or pre-enrichment steps were carried out before quantification. These values may be eventually improved by increasing the incubation time for low bacteria concentrations, as well as by working with a larger sample volume.

3.4. Selectivity

The selectivity of the developed screen-printed magnetoimmunosensor for *S. pneumoniae* detection was investigated against other streptococci that may be present in clinical samples and also against phylogenetically unrelated bacteria such as *E. coli*. These studies were accomplished by checking the immunosensor amperometric responses at two different concentration levels, 1.0×10^7 and $5.0 \times 10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$. The results were similar at both levels. Moreover, taking into account that *S. pneumoniae* Dawn was the strain yielding the highest response among all the bacteria tested, all signals were normalized to that obtained with this strain (Fig. 4). The nonencapsulated R6 strain produced almost a

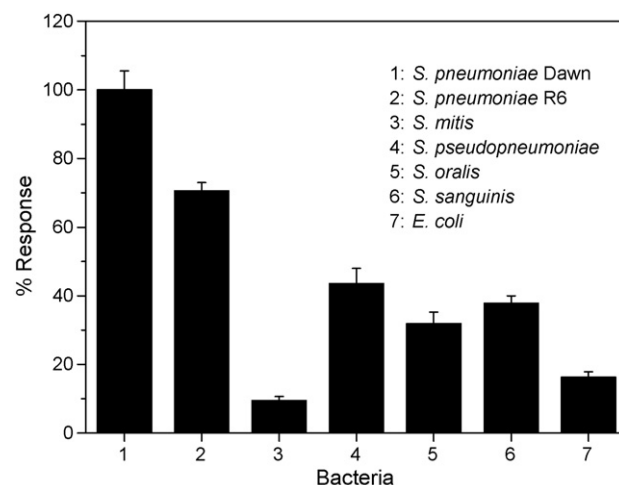


Fig. 4. Immunosensors specificity towards other bacteria. Relative response obtained for other bacteria ($1.0 \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$) in comparison with *S. pneumoniae* Dawn. Other conditions as in Fig. 3. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$).

70% of the signal provided by Dawn strain, while *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis* and *S. sanguinis* yielded responses lower than 40%. The existence of cross-reactions between pneumococci and phylogenetically related streptococci was not completely unexpected since *S. pneumoniae*, *S. pseudopneumoniae*, *S. oralis*, and *S. sanguinis* form part of a very similar group of species named streptococci of the mitis group (Kawamura et al., 1995). The taxonomy of this group remains challenging (Bishop et al., 2009). However, why *S. mitis*, another member of the mitis group, did not show any significant cross-reaction is unclear.

3.5. Quantification of *S. pneumoniae* in inoculated urine samples

The usefulness of the disposable amperometric magnetoimmunosensors was evaluated by determining *S. pneumoniae* in urine samples. Calibration graphs for *S. pneumoniae* cells in urine (inoculated with R6 or Dawn strains) were constructed over the 1.0×10^5 to $5.0 \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$ range following the same methodology used for standard solutions in order to evaluate the potential matrix effect. A statistical comparison (by applying the Student's t -test at the 0.05 significance level) of the slope values [$(2.3 \pm 0.8) \times 10^{-7}$ and $(2.8 \pm 0.7) \times 10^{-7} \text{ A}$, for *S. pneumoniae* R6 and Dawn strains, respectively] with those mentioned above for standards in PBS buffer [$(2.9 \pm 0.7) \times 10^{-7}$ and $(2.7 \pm 1.0) \times 10^{-7} \text{ A}$, respectively] allowed us to deduce that no matrix effect existed for urine samples. Therefore, the sample analysis was accomplished by interpolation of the corresponding amperometric signals into the standard calibration plots. Urine samples inoculated with $1.0 \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$ *S. pneumoniae* R6 or with *S. pneumoniae* Dawn at two different concentration levels (5.0×10^4 and $1.0 \times 10^6 \text{ cfu mL}^{-1}$) were analyzed. Analysis of five inoculated urine samples yielded *S. pneumoniae* mean contents of $(1.3 \pm 0.3) \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$ for R6 and $(6.3 \pm 0.2) \times 10^4$ and $(1.0 \pm 0.2) \times 10^6 \text{ cfu mL}^{-1}$ for Dawn, (confidence interval calculated for $\alpha = 0.05$). The total time for the assay, once the immunosensor was prepared, was of approximately 3.5 h, although as mentioned above, it is possible to carry out the determination of *S. pneumoniae* ($2.0 \times 10^6 \text{ cfu}$) in only 1.5 h. Taking into account that the diagnosis of urinary tract infection (UTI) is considered positive if $>10^5 \text{ cfu mL}^{-1}$ of a single bacterium is found in urine cultures (García-Suárez et al., 2009), these results show fairly well the usefulness of the developed magnetoimmunosensor to be used in UTI detection without previous preconcentration steps or sample pre-treatments.

4. Conclusions

Disposable amperometric sensors, combining the use of modified MBs and specific capture and detection antibodies for the first time, have demonstrated a good performance for the rapid and selective quantification of *S. pneumoniae*. An acceptable detection limit, without pre-enrichment steps, of 3.0×10^3 cfu was achieved and up to 30 sensors per day can be prepared and used. It is important to remark that this is the first time, to our knowledge, that an immunosensor based on the use of novel antibodies is reported for the whole bacterium detection. The assay takes only a few hours to be performed, as opposed to days for culture-based techniques, and is reliable enough to facilitate the rational reduction of antibiotic prescription for the appropriate treatment of *S. pneumoniae* infection. Furthermore, the developed methodology has been shown to be suitable for detecting 1.0×10^4 cfu of *S. pneumoniae* in inoculated urine samples without any pretreatment and may be an improvement over blood cultures in making an early diagnosis and/or after antibiotic administration. Moreover, this new methodology does not require antibodies produced in two different animal species, and its simplicity and easy automation and miniaturization of the required instrumentation make feasible its use as an alternative diagnostic tool in laboratory and in the development of devices for on-site analysis.

Acknowledgements

This research was supported by grants from the Dirección General de Investigación Científica y Técnica (SAF2006-00390 and SAF2009-10824). The financial support of Santander/Complutense Research Project PR 27/05-13953, the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación Research Project CTQ2009-09351BQU, and the AVANSENS Programme from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are also gratefully acknowledged. S. Campuzano acknowledges a “Juan de la Cierva” research contract to the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.bios.2010.06.011](https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.06.011).

References

- Anderson, G.P., Taitt, C.R., 2008. *Sens. Lett.* 6, 213–218.
- Andreo, F., Domínguez, J., Ruiz, J., Blanco, S., Arellano, E., Prat, C., Morera, J., Ausina, V., 2006. *Respir. Med.* 100, 884–891.
- Bange, A., Halsall, H.B., Heineman, W.R., 2005. *Biosens. Bioelectron.* 20, 2488–2503.
- Barletta, J., Bartolome, A., Constantine, N.T., 2009. *J. Virol. Methods* 157, 122–132.
- Bishop, C.J., Aanensen, D.M., Jordan, G.E., Kilian, M., Hanage, W.P., Spratt, B.G., 2009. *BMC Biol.* 7, 3–22.
- Campuzano, S., Pedrero, M., Pingarrón, J.M., 2005. *Talanta* 66, 1310–1319.
- Centi, S., Laschi, S., Mascini, M., 2007. *Talanta* 73, 394–399.
- Corless, C.E., Guiver, M., Borrow, R., Edwards-Jones, V., Fox, A.J., Kaczmarek, E.B., 2001. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1553–1558.
- de los Toyos, J.R., Méndez, F.J., Aparicio, J.F., Vázquez, F., García Suárez, M.d.M., Fleites, A., Hardisson, C., Morgan, P.J., Andrew, P.W., Mitchell, T.J., 1996. *Infect. Immun.* 64, 480–484.
- Dowell, S.F., Garman, R.L., Liu, G., Levine, O.S., Yang, Y.H., 2001. *Clin. Infect. Dis.* 32, 824–825.
- Editorial, 2009. *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 838.
- Ehara, N., Fukushima, K., Kakeya, H., Mukae, H., Akamatsu, S., Kageyama, A., Saito, A., Kohno, S., 2008. *J. Med. Microbiol.* 57, 820–826.
- García-Suárez, M.d.M., Cima-Cabal, M.D., Villaverde, R., Espinosa, E., Falguera, M., Toyos, J.R., de los, Vázquez, F., Méndez, F.J., 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3549–3554.
- García-Suárez, M.d.M., Cron, L.E., Suárez-Álvarez, B., Villaverde, R., González-Rodríguez, I., Vázquez, F., Hermans, P.W.M., Méndez, F.J., 2009. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 443–453.
- Gisselsson-Solén, M., Bylander, A., Wilhelmsson, C., Hermansson, A., Melhus, A., 2007. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3003–3007.
- Harris, K.A., Turner, P., Green, E.A., Hartley, J.C., 2008. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2751–2758.
- Hsing, I.-M., Ying, X., Wenting, Z., 2007. *Micro- and nano-magnetic particles for applications in biosensing. Electroanalysis* 19, 755–768.
- Kawamura, Y., Hou, X.G., Sultana, F., Miura, H., Ezaki, T., 1995. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 406–408.
- Kim, J.S., Anderson, G.P., Erickson, J.S., Golden, J.P., Nasir, M., Ligler, F.S., 2009. *Anal. Chem.* 81, 5426–5432.
- Lasocki, S., Scanvic, A., Le Turdu, F., Restoux, A., Mentec, H., Bleichner, G., Sollet, J.P., 2006. *Intensive Care Med.* 32, 1766–1772.
- Loaiza, Ó.A., Campuzano, S., Pedrero, M., Pividori, M.I., García, P., Pingarrón, J.M., 2008. *Anal. Chem.* 80, 8239–8245.
- Marquette, C.A., Blum, L.J., 2006. *Biosens. Bioelectron.* 21, 1424–1433.
- Matsunaga, T., Okamura, Y., 2002. *Int. J. Nanosci.* 1, 383–389.
- Moore N.J., Fent M. K., Koulchin V.A., Molokova E.V., 2004. United States Patent US 6,824,997 B1.
- Nam, J.M., Thaxton, C.S., Mirkin, C.A., 2003. *Science* 301, 1884–1886.
- Navarro, D., García-Maset, L., Gimeno, C., Escribano, A., García-de-Lomas, J., Network, t.S.P.I.S., 2004. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4853–4855.
- Rai, G.P., Zachariah, K., Sharma, R., Phadake, S., Belapurkar, K.M., 2004. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 27, 217–223.
- Richardson, J., Hawkins, P., Luxton, R., 2001. *Biosens. Bioelectron.* 16, 989–993.
- Rouphael, N.G., Atwell-Melnick, N., Longo, D., Whaley, M., Carlone, G.M., Sampson, J.S., Ades, E.W., 2008. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 62, 23–25.
- Rosi, N.L., Mirkin, C.A., 2005. *Chem. Rev.* 105, 1547–1562.
- Samra, Z., Shmueli, H., Nahum, E., Paghis, D., Ben-Ari, J., 2003. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 45, 237–240.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., García, E., 1992. Immobilization and single-step purification of fusion proteins using DEAE-cellulose. *Eur. J. Biochem.* 203, 153–159.
- Selvaraju, T., Das, J., Han, S.W., Yang, H., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 932–938.
- Stralin, K., Törnqvist, E., Kaltoft, M.S., Olcén, P., Holmberg, H., 2006. *J. Clin. Microbiol.* 44, 643–645.
- Stuert, K., Merx, I., Eiffert, H., Schmutzhard, E., Mäder, M., Nau, R., 1998. *J. Clin. Microbiol.* 36, 2346–2348.
- Willner, I., Baron, R., Willner, B., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1841–1852.
- Zacco, E., Pividori, M.I., Alegret, S., Galve, R., Marco, M.P., 2006. *Anal. Chem.* 78, 1780–1788.
- Zhang, H., Cheng, X., Richter, M., Greene, M.I., 2006. *Nat. Med.* 12, 473–477.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Disposable amperometric magnetoimmunosensors for the specific detection of *Streptococcus pneumoniae*

Susana Campuzano, Berta Esteban-Fernández de Ávila, José Yuste, María Pedrero, José Luis
García, Pedro García, Ernesto García, and José Manuel Pingarrón*

Materials and methods

Bacteria and growth conditions

The bacteria strains used in this study were: *S. pneumoniae* R6 (nonencapsulated) (Hoskins et al., 2001), *S. pneumoniae* TIGR4 (serotype 4) (Tettelin et al., 2001), *S. pneumoniae* Dawn (serotype 37) (Llull et al., 2000), and the type strains of *Streptococcus pseudopneumoniae* (CCUG 44455), *S. mitis* (NCTC 12261), *S. oralis* (NCTC 11427), *Streptococcus sanguinis* CECT 480, and *Streptococcus constellatus* NCTC 10708. In addition, *E. coli* DH5 α was also employed (Sambrook et al., 2001). All streptococci tested were grown in C medium (Lacks and Hotchkiss, 1960) supplemented with yeast extract (0.8 mg mL⁻¹; Difco Laboratories) (C+Y medium) and incubated at 37 °C without shaking up to an optical density (at 550 nm) of approximately 0.4. When this optical density was reached, stocks were prepared in sterile glycerol (10%). Bacterial counts were determined by plating appropriate dilutions on 5% sheep blood agar plates. *E. coli* cells were grown in Luria-Bertani (LB) (Scharlau) broth at 37 °C with aeration.

To prepare bacterial suspensions, an appropriate volume of the corresponding stock solution was centrifuged at 4 °C (15,000 \times g, 10 min), the supernatant was discarded and the cells

resuspended in PBS (pH 6.8) (or directly in fresh urine for the analysis of real samples) to achieve a $\approx 10^8$ cfu mL⁻¹ bacterial stock suspension.

Flow cytometry experiments

Ten μ L of a stock suspension of bacteria at the appropriate concentration were transferred into a 1.5 mL tube to obtain a final concentration of 10^7 cfu. The primary antibody solution (≈ 1 μ g μ L⁻¹) was diluted 25 times, 10 μ L (≈ 0.4 μ g) were added and the mixture was incubated at 37 °C for 60 min. Control samples were also prepared by adding PBS (pH 6.8) instead of primary antibody. After incubation, the cells were washed twice with 300 μ L of washing solution (PBS, pH 6.8, containing 0.01% Tween 20) followed by incubation for 60 min in the dark with the appropriate labeled-IgG secondary antibodies (sheep anti-rabbit-IgG:DyLight™ 649 and goat anti-mouse-IgG:DyLight™ 649, both from AbD Serotec), diluted 1:250 in PBS (pH 6.8) containing 0.01% Tween 20. Cells were centrifuged, and washed twice with 300 μ L of washing solution. Bacteria were fixed in the dark during 2–3 min in 100 μ L of 3% paraformaldehyde. Afterwards, 300 μ L of PBS (pH 6.8) were added to allow sufficient volume for further analysis by flow cytometry. Samples were transferred to flow cytometer tubes and kept in the dark until used. The cells were vortexed briefly before analysis and at least 5,000 events per tube were acquired. Thereafter, the cells were assessed for fluorescence by histogram analysis.

Production of hyperimmune rabbit sera

Antisera directed against C-LytA, type 37 capsular polysaccharide (anti-S37) or unencapsulated pneumococcal cells (anti-R) were raised in rabbits following published procedures (Sánchez-Puelles et al., 1992; Lund and Henrichsen, 1978). Animal experiments conformed to the Spanish government legislation were performed at Centro de

Investigaciones Biológicas (Madrid, Spain) following institutional guidelines for animal use and care.

Purification of the IgGs from hyperimmune rabbit sera

Purification of IgGs and removing of albumin from rabbit antisera were accomplished with NAb Protein A Plus Spin Columns (Pierce). The purity of the IgGs was assessed by performing denaturing gel electrophoresis with a Bio-Rad mini protein III system, according to the basic SDS-PAGE protocol (Laemmli, 1970) for analysis of IgGs under reduced conditions (Murray et al., 2001).

Optimization of variables

As an example, the concentration of capture antibody was optimized by testing the ratio between the specific and nonspecific signals for capture antibody concentrations between 0 and 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The results obtained (not shown) showed that the nonspecific signals were high in the absence of capture antibody due to the immobilization of the detection antibody on the MBs modified with Protein A. An increase in the concentration of the capture antibody until 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ led to a significant reduction in nonspecific signals, since binding sites of protein A were occupied by the capture antibody and the detection antibody was immobilized only in the presence of bacteria. Above 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, although nonspecific signals remained unchanged, the specific ones decreased, possibly because high capture antibody loadings on the MBs hindered the bacteria recognition reaction by steric hindrance. Taking into account that the largest specific-to-nonspecific signal/ratio was obtained at 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, this antibody concentration was selected for further work.

The detection antibody concentration was checked between 0 and 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As expected, the response obtained was negligible (*i.e.*, no electrocatalytic reduction of H_2O_2 was produced

at the TTF-Au/SPEs) in the absence of detection antibody. Although, in general, specific signals increase with the concentration of detection antibody, nonspecific signals also increase, so the more favorable ratio was observed for a concentration of HRP-labeled antibody between 10 and 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, the latter being selected for work.

We tested the effect of the incubation time in the three different incubation steps performed, *i.e.*, protein A-MBS with capture antibody, MBs-capture antibody conjugate with bacteria, and MBs-capture antibody-bacteria conjugate with detection antibody. It could be observed that the best specific-to-nonspecific signals ratio was accomplished with 60 min for the three incubations. It is worth to remark that although the specific-to-nonspecific signal ratio decreased about 25 % using only 30 min incubation for each step, it was possible to identify *S. pneumoniae* in only 1.5 h. Finally, 100 μL of the capture and detection antibodies solutions and 200 μL of the bacterial suspension were chosen as optimum conditions. The variables involved in the electrochemical detection (H_2O_2 concentration, TTF loading and applied potential) were identical to those optimized previously for genosensors using Au/SPEs (Loaiza et al., 2008).

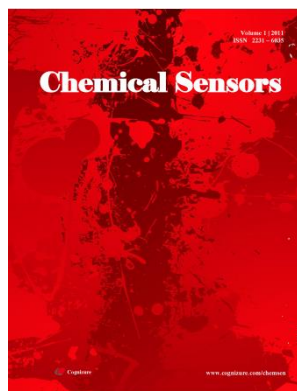
References

- Hoskins, J., Alborn, W.E., Jr., Arnold, J., Blaszcak, L.C., Burgett, S., DeHoff, B.S., Estrem, S.T., Fritz, L., Fu, D.-J., Fuller, W., Geringer, C., Gilmour, R., Glass, J.S., Khoje, H., Kraft, A.R., Lagace, R.E., LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Lefkowitz, E.J., Lu, J., Matsushima, P., McAhren, S.M., McHenney, M., McLeaster, K., Mundy, C.W., Nicas, T.I., Norris, F.H., O'gara, M., Peery, R.B., Robertson, G.T., Rockey, P., Sun, P.-M., Winkler, M.E., Yang, Y., Young-Bellido, M., Zhao, G., Zook, C.A., Baltz, R.H., Jaskunas, R., Rosteck, P.R.J., Skatrud, P.L., Glass, J.I., 2001. *J. Bacteriol.* 183, 5709-5717.
- Lacks, S., Hotchkiss, R.D., 1960. *Biochim Biophys Acta* 39, 508-517.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Llull, D., López, R., García, E., 2000. *Microb. Drug Resist.* 6, 269-275.
- Loaiza, Ó.A., Campuzano, S., Pedrero, M., Pividori, M.I., García, P., Pingarrón, J.M., 2008. *Anal. Chem.* 80, 8239-8245.
- Lund, E., Henrichsen, J., 1978. *Methods Microbiol.* 12, 241-262.
- Murray, A., Smith, R.G., Brady, K., Williams, S., Badley, R.A., Price, M.R., 2001. *Anal. Biochem.* 296, 9-17.
- Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Puelles, J.M., Sanz, J.M., García, J.L., García, E., 1992. *Eur J Biochem* 203, 153-159.
- Tettelin, H., Nelson, K.E., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Peterson, S., Heidelberg, J., DeBoy, R.T., Haft, D.H., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Peterson, J.D., Umayam, L.A., White, O., Salzberg, S.L., Lewis, M.R., Radune, D., Holtzapple, E., Khouri, H., Wolf, A.M., Utterback, T.R., Hansen, C.L., McDonald, L.A., Feldblyum, T.V., Angiuoli, S., Dickinson, T., Hickey, E.K., Holt, I.E., Loftus, B.J., Yang, F., Smith, H.O., Venter, J.C., Dougherty, B.A., Morrison, D.A., Hollingshead, S.K., Fraser, C.M., 2001. *Science* 293, 498-506.

Electrochemical magneto-immuno-PCR approach for direct and highly sensitive detection of *Streptococcus pneumoniae*

Campuzano, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Pedrero, M.;
García, J. L.; García, E.; García, P.; Pingarrón, J. M.



Vol. 1 p. 1–8, 2011

Electrochemical magneto-immuno-PCR approach for direct and highly sensitive detection of *Streptococcus pneumoniae*

Susana Campuzano^{a,b}, Berta Esteban-Fernández de Ávila^a, María Pedrero^a, José L. García^b, Ernesto García^{b,c}, José M. Pingarrón^{a,*}, Pedro García^{b,c}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

^b Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas CSIC, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

^c Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias, (CIBERES, initiative of Instituto de Salud Carlos III)

*Author for correspondence: José M. Pingarrón, email: pingarro@quim.ucm.es
Received 23 Dec 2010; Accepted 30 Jan 2011

Abstract

A magneto-electrochemical immunoassay approach coupled to direct asymmetric PCR (DaPCR) of the bacteria attached to capture antibody-Protein A-magnetic beads (MBs) is reported. DaPCR was used to amplify a characteristic 235-bp region of the gene coding for the major pneumococcal autolysin (*lytA*). The predominantly single-stranded and biotinylated amplicons were subsequently hybridized onto streptavidin-MBs modified with a specific biotinylated 20-mer capture probe. After binding a streptavidin-peroxidase polymer to the resultant biotinylated hybrid, the modified MBs were captured by a magnet on the surface of a TTF-modified gold screen-printed electrode (Au/SPE). The amperometric response measured at -0.15 V after the addition of hydrogen peroxide was used to monitor the hybridization process. DaPCR amplicons could be obtained with only 20 cfu of *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*), whereas no amplicon was obtained in the presence of high concentrations ($\sim 1.0 \times 10^8$ cfu mL⁻¹) of other streptococci. The developed methodology allows an easy differentiation between 100 cfu mL⁻¹ *S. pneumoniae* cultures and the asymmetric PCR blank control. Calibration curves were constructed for R6 and Dawn serotypes, with limits of detection (LODs) of 132 and 130 cfu mL⁻¹, respectively. These values are approximately 100-1000 times lower than those obtained with disposable electrochemical magnetoimmunosensors without PCR amplification.

Keywords: Electrochemical magnetoimmunosensing; PCR amplification; *Streptococcus pneumoniae*

1. Introduction

The accurate identification and rapid diagnosis of pneumococcal infections is still a challenge due to the relevant implications in the prompt and efficient selection of antimicrobial agents for therapy [1]. Although some interesting methodologies have been implemented in the last years with this purpose [2-11], they exhibit important limitations in terms of sensitivity, rapidity and/or selectivity. In an attempt to overcome these drawbacks, we have reported recently the preparation of disposable electrochemical magnetoimmunosensors for *S. pneumoniae* [12]. Protein A-coated magnetic beads (MBs) were used as a solid phase to immobilize specific *S. pneumoniae* capture antibodies. A sandwich procedure was employed, in which the same antibody conjugated to an enzyme label, horseradish peroxidase (HRP), was used as the detection antibody recognizing the captured *S. pneumoniae* cells. Amperometric detection of

the enzyme product was performed at a disposable gold screen-printed electrode (Au/SPE), using tetrathiafulvalene (TTF) as electron transfer mediator and H₂O₂ as the enzyme substrate. Although the LODs achieved, 1.5×10^4 and 6.3×10^5 cfu mL⁻¹ for *S. pneumoniae* Dawn and R6 serotypes, respectively, were reasonably good considering that no pre-concentration or pre-enrichment steps were involved we wanted to improve the sensitivity of this methodology. In order to do that, we report here the coupling of the magneto-electrochemical immunoassay approach mentioned above with direct asymmetric PCR (DaPCR) of the bacteria attached to the capture antibody-Protein A-MBs. Recently, we demonstrated that the use of disposable magnetic DNA hybridization amperometric sensors constitutes an efficient strategy for the rapid and sensitive detection of DaPCR products obtained from *Escherichia coli* (*E. coli*) bacterial cultures [13].

Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus*

Esteban-Fernández de Ávila, B.; Pedrero, M.;
Escamilla-Gómez, V.; Campuzano, S.; Pingarrón, J. M.



Vol. 403 p. 917–925, 2012

Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of Staphylococcus aureus

**Berta Esteban-Fernández de Ávila, María
Pedrero, Susana Campuzano, Vanessa
Escamilla-Gómez & José M. Pingarrón**

**Analytical and Bioanalytical
Chemistry**

ISSN 1618-2642

Volume 403

Number 4

Anal Bioanal Chem (2012) 403:917-925

DOI 10.1007/s00216-012-5738-8



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

Sensitive and rapid amperometric magnetoimmunosensor for the determination of *Staphylococcus aureus*

Berta Esteban-Fernández de Ávila · María Pedrero ·
 Susana Campuzano · Vanessa Escamilla-Gómez ·
 José M. Pingarrón

Received: 14 October 2011 / Revised: 11 January 2012 / Accepted: 11 January 2012 / Published online: 31 January 2012
 © Springer-Verlag 2012

Abstract The preparation and characteristics of a disposable amperometric magnetoimmunosensor, based on the use of functionalized magnetic beads (MBs) and gold screen-printed electrodes (Au/SPEs), for the specific detection and quantification of Staphylococcal protein A (ProtA) and *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is reported. An antiProtA antibody was immobilized onto ProtA-modified MBs, and a competitive immunoassay involving ProtA antigen labelled with HRP was performed. The resulting modified MBs were captured by a magnetic field on the surface of tetrathiafulvalene-modified Au/SPEs and the amperometric response obtained at -0.15 V vs the silver pseudo-reference electrode of the Au/SPEs after the addition of H_2O_2 was used as transduction signal. The developed methodology showed very low limits of detection (1 cfu *S. aureus*/mL of raw milk samples), and a good selectivity against the most commonly involved food-borne pathogens originating from milk. These features, together with a short analysis time (2 h), the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation make the developed methodology a promising alternative in the development of devices for on-site analysis.

Keywords Electrochemical magnetoimmunosensor · Protein A · *Staphylococcus aureus* · Raw milk

Introduction

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) is an important pathogen that constitutes a potential danger to human health [1]. It exists as a harmless commensal in approximately 25% of humans [2, 3] but also can cause skin and soft tissue infections, pneumonia, pericarditis and even sepsis [3, 4]. These illnesses are produced by the ingestion of food contaminated by enterotoxins synthesized by *S. aureus*, which produce gastroenteritis characterized by nausea, vomiting, abdominal cramps and diarrhoea within 2–6 h after the ingestion [5–7]. As a consequence, the detection of the bacterium in processed food, in particular, in raw and cooked meat, as well as milk and dairy products which are mainly responsible for the transmission to humans [7] is very important in clinical diagnosis.

Standard microbiological culture tests, traditionally performed to detect and enumerate *S. aureus*, although sensitive and specific are time-consuming, require skilled personal and need from 24 to 48 h to provide responses [7]. Consequently, efforts to set up alternative molecular tools relying on the recognition of one of the pathogen components by specific probes [8] or antibodies for immunological assays [9–12] have been described.

As foods contain relatively few *S. aureus* bacteria, an enrichment procedure to isolate them is normally performed, the complete protocol requiring up to 5–6 days [13, 14]. However, the use of specific metabolites of *S. aureus* to indicate its presence in an enrichment broth can greatly reduce the time required to detect the bacterium [4]. Protein A (ProtA) is a protein covalently anchored to the cell wall of *S. aureus* with a molecular weight between 35 and 50 kDa. It is a specific product of this bacterium contained by about 99% bacterial strains [15–17]. ProtA contains five repeated units, each with the ability to mediate high-affinity binding to Fc portion of several mammalian immunoglobulin

Published in the special issue *Euroanalysis XVI (The European Conference on Analytical Chemistry)* with guest editor Slavica Ražić.

B. Esteban-Fernández de Ávila · M. Pedrero · S. Campuzano ·
 V. Escamilla-Gómez · J. M. Pingarrón (✉)
 Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas,
 Universidad Complutense de Madrid,
 28040 Madrid, Spain
 e-mail: pingarro@quim.ucm.es

subclasses, especially IgG ($K_a=10^8$ mol; only two sites can bind at a time). It also has affinity for Fab domain encoded by some specific immunoglobulin heavy chain gene families [15, 16]. Following this direction, a few immunosensors have been described for the detection of either ProtA or *S. aureus* bacteria. Electrochemical transduction systems used have been either amperometric [18–27], piezoelectric [28] or impedimetric [29]. Still, the sensitivity achieved with most of these methods does not always reach the maximum allowed limit legislated for *S. aureus* in foodstuffs (absence, 10 or 10^2 cfu g⁻¹, these values depending on the nature of the foodstuff [30, 31]). Thus, seeking novel immobilization strategies oriented to improve sensitivity for application in real samples is highly desirable.

The use of immunomagnetic separation involving the immobilization of antibodies to micro-sized paramagnetic beads and using the antibody-coated beads to trap directly targeted bacteria from liquid media has become very popular [32–36]. Magnetic beads (MBs) facilitate efficient bacteria retrieval and concentration, reduce largely the assay time and favour analytical procedures more applicable to higher sample throughput and automation [35]. The use of MBs has also been considered a methodological approach that enhances sensitivity and reduces detection time in electrochemical immunosensors performance [37–43]. Moreover, their use allows the separation of steps related to the immunoreaction from those concerning the electrochemical detection thus facilitating the transduction of the affinity event [44].

This paper describes the development of disposable electrochemical magnetoimmunosensors for Staphylococcal ProtA and *S. aureus* specific analysis at very low concentration levels as a rapid method which may be applied for on-site food quality control. AntiProtA antibody is immobilized onto ProtA-modified MBs, and a competitive immunoassay involving ProtA antigen labelled with horseradish peroxidase (HRP) is performed. The electrochemical detection of the enzyme product is carried out at a disposable gold screen-printed electrode (Au/SPE), using tetrathiafulvalene (TTF) as electron transfer mediator and H₂O₂ as the enzyme substrate. The immunosensor performance, including the analytical characteristics for the determination of ProtA and *S. aureus* cells and the selectivity against other bacteria are evaluated. Finally, the disposable magnetoimmunosensors have been successfully applied to the analysis of low level inoculated raw milk samples.

Experimental

Apparatus and electrodes

Amperometric measurements were carried out with an ECO Chemie Autolab PSTAT 10 potentiostat using the software

package GPES 4.9 (General Purpose Electrochemical System). A P-Selecta (Scharlab) ultrasonic bath, an autoclave (Raypa AES-75), a horizontal laminar flow Hood/Cabin *Telstar* mod. AH-100 and an Optic Ivymen[®] System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A.) were also used. Au/SPEs (220AT, 4-mm Ø) were purchased from Dropsens. These screen-printed electrodes included a silver pseudo-reference electrode and a gold counter electrode. A neodymium magnet (AIMANGZ) was used to control the attraction of the modified MBs to the modified Au/SPE surfaces. Magnetic separation during the washing steps was performed using a DynaMag[™]-2 (DynaL Biotech ASA) magnetic particle concentrator.

Reagents and solutions

Wild-type *Escherichia coli* (*E. coli*; CECT 515), *S. aureus* (CECT 59) and *Salmonella choleraesuis* (*S. choleraesuis*; CECT 700) were obtained from the Spanish Collection of Type Cultures. ProtA-modified MBs (30 mg mL⁻¹; Dynabeads[®] Protein A), were purchased from Dynal Biotech ASA; ProtA from *S. aureus* Cowan I strain cells, *S. aureus* ProtA-peroxidase-labelled, *S. aureus* cells (Sigma; 10% wet w/v of essentially non-viable *S. aureus* Cowan I strain cells in 0.04 M sodium phosphate buffer, pH 7.2, 0.15 M sodium chloride containing 0.05% sodium azide) and hydrogen peroxide were supplied by Sigma. AntiProtA (*S. aureus*) polyclonal antibodies were from Abcam.

Stock solutions of ProtA-HRP (0.5 µg mL⁻¹) were prepared in 10 mM sodium phosphate saline buffer solution (PBS; pH 6.8) containing 138 mM NaCl (Scharlau) and 2.7 mM KCl (Scharlau). Stock 0.1 M H₂O₂ solutions were prepared daily in a 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.0).

Other solutions employed, prepared in deionized water, were: TP (pH 7.0) consisting of 0.1 M sodium phosphate buffer; B&W buffer (pH 8.2), consisting of 0.1 M sodium phosphate buffer containing 0.01% Tween 20; PBS (pH 6.8) containing 0.01% Tween 20; a 0.5 M H₂SO₄ (Scharlau) solution containing 10 mM KCl and a 0.5 M TTF (Aldrich) solution prepared in acetone (Sigma-Aldrich).

All chemicals used were of analytical-reagent grade, and deionized water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm). Skimmed milk samples were purchased in a local supermarket.

Bacterial cultures

Wild-type *E. coli* and *S. aureus* belong to the microorganism biosafety level 2 group, while *S. choleraesuis* belongs to the level 1 group. Consequently, all safety considerations concerning these groups were accomplished in the manipulation of these bacteria [45]. *E. coli* and *S. aureus* were grown overnight in Luria–Bertani Broth (LB; Scharlau) while *S. choleraesuis* was grown in tryptic soy broth (Fluka), at 37 °C

with aeration and shaking, which allowed the growing stationary phase to be reached.

Then, several dilutions of these mother growth media were made (tenfold steps), and 10 μL of the diluted solutions were transferred to LB agar plates (*E. coli* and *S. aureus*) or to TSA agar (TSA) plates (*S. choleraesuis*) and incubated for 24 h at 37 °C for enumeration of colonies. At the same time, the stationary-phase cultures, previously subjected to ultrasonication cell wall lyses for 30 min, were diluted to $1\text{--}10^7$ cfu mL^{-1} in PBS buffer (pH 6.8) or in milk samples.

Pretreatment of Au/SPEs

Fifty microliters of a 0.5 M H_2SO_4 solution containing 10 mM KCl were deposited onto the surface of the Au/SPEs and the potential was cycled ten times between 0.0 and +1.25 V at a scan rate of 100 mV s^{-1} . The treated electrodes were rinsed with water and dried under a N_2 flow.

Modification of MBs

A suspension of 5 μL of ProtA-modified MBs was transferred into a 1.5 mL tube. The MBs were washed twice with 100 μL B&W buffer solution and once with PBS buffer solution to remove the NaN_3 preservative and resuspended in 100 μL of this buffer containing 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of the antibody. The antibody was captured onto the beads during 30 min at 37 °C under continuous stirring (600 rpm). Subsequently, the antibody-modified MBs were washed twice with 100 μL of PBS buffer solution. Each washing step consisted of resuspension of MBs in the washing solution for 2 min, followed by separation with the magnet holding block to remove the supernatant. The antibody-coated MBs were resuspended in 50 μL of PBS buffer (pH 6.8) containing either ProtA or *S. aureus* suspension (non-viable commercial or fresh growth bacteria with or without lyses by ultrasonication). After 30 min incubation at 37 °C under stirring (600 rpm), the ProtA or *S. aureus* -antibody-attached MBs were washed twice with 100 μL of PBS buffer solution. Thereafter, incubation with ProtA-HRP was accomplished by re-suspending the modified MBs in 200 μL of 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ enzyme-conjugated ProtA solution prepared in PBS (pH 6.8). The recognition reaction was left to proceed for 30 min at 37 °C with continuous mixing (600 rpm). The resulting modified MBs were then washed twice with 100 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) and resuspended in 45 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer solution, pH 7.0.

Deposition of MBs onto the TTF-Au/SPEs

Activated Au/SPEs were modified by placing 5 μL of 0.5 M TTF solution on their surface, and let to dry at room temperature. Modified MBs were captured on the TTF-Au/SPEs

surface by placing a neodymium magnet under the working electrode surface.

Amperometric measurements

Amperometric measurements were carried out at room temperature by placing 45 μL of the modified MBs suspension onto the TTF-Au/SPEs surface, covering the three electrodes area. When a background steady-state current was obtained, at an applied potential of -0.15 V vs. the Ag pseudoreference electrode, 5 μL of a 0.35 mM H_2O_2 solution were deposited on the bioelectrode surface and the change in the current recorded. Analytical measurements were performed after 180 s of H_2O_2 addition.

Milk analysis

Samples of *commercial milk* were inoculated with *S. aureus* cells in concentrations ranging from 1.0 to 1.0×10^7 cfu mL^{-1} . Aliquots (50 μL) of undiluted and untreated inoculated milk samples were analyzed following the methodology described above for standard bacterial solutions.

Results and discussion

The disposable magnetoimmunosensors developed, based on competitive configurations, are schematically displayed in Fig. 1. The target antigen, ProtA, either in solution or anchored to the walls of *S. aureus* cells exhibits high affinity for both the Fab and the Fc regions of the antibody employed (antiProtA). Consequently, the interaction between ProtA-modified MBs and antiProtA can occur in two ways: (a) the antibody can either be immobilized in an antigenic unspecific manner through the Fc region leaving the antigen recognition sites of the Fab region free and facing the solution, or (b) the antibody can be immobilized on the MBs-ProtA in an antigenic specific manner leaving the Fc region free and exposed to the solution. Indeed, both possibilities allowed the determination of ProtA or *S. aureus* cells through a competitive immunoassay with ProtA-HRP. Thus, capture antibodies were coupled to the ProtA-coated MBs through the commented high affinity of ProtA for the Fc and Fab regions of the antibody. Then, either ProtA or the bacteria were captured by a 30-min conjugation step. This step was followed by further 30-min incubation with the HRP-labelled antigen to compete for the binding sites of the bacteria (or ProtA)-capture antibody-MBs conjugate. After each step, MBs were separated from the supernatant by placing the tubes in a magnet separator until they migrated to the tube sides and the liquid was clear. To shuttle electrons between the oxidized enzyme and the Au working electrode, MBs modified with the immunosensing complex were immobilized on top of a TTF-

electron mediator-modified Au/SPE by means of a neodymium magnet placed under the working electrode surface. The biorecognition event was monitored upon addition of hydrogen peroxide, which is reduced in the presence of HRP, the enzyme regeneration being mediated by TTF. Therefore, the generated TTF⁺ was electrochemically reduced at an applied potential more negative than the formal potential of the TTF/TTF⁺ redox couple [46]. In this way, the TTF-Au/SPE only acts a transducer of the recognition event as the immuno-reactions occur on the surface of the MBs.

The suitability of the proposed assay design was verified by comparing the amperometric responses obtained at an applied potential of -0.15 V (vs the Ag pseudoreference electrode) after implementing the protocol in the presence and the absence of bacteria (Fig. 1b). The measured current was approximately two times lower when the process was performed in the presence of 10^5 cfu mL⁻¹ *S. aureus*, demonstrating that a lower amount of ProtA-HRP was attached in the presence of bacteria and that the proposed competitive immunoassay was suitable for the electrochemical detection of the bacteria–antibody recognition process.

A usual drawback found in the development of electrochemical immunosensors is the presence of non-specific adsorptions on the electrode surface, which make necessary to use blocking agents. This problem can be avoided if the immunosensor reaction is performed at non-electrode surfaces such as MBs. Moreover, preliminary studies (not shown) showed that very low amperometric signals were observed when ProtA-HRP (0.1 µg mL⁻¹) was incubated in a ProtA-MBs solution in the absence of antiProtA, thus demonstrating that no unspecific adsorptions of the enzymatically labelled antigen, ProtA-HRP, occurred on the ProtA-modified MBs. However, the amperometric signal increased ten times when ProtA-MBs had been firstly incubated in a

20 µg mL⁻¹ antiProtA solution. These assays verified the suitability of the proposed scheme for the electrochemical detection of ProtA–antibody and bacteria–antibody recognition processes.

Optimization of experimental variables

Optimization of several variables for the immunoassay on the MBs, such as the concentration of the capture antibody and labelled antigen, or the time elapsed for the different incubation steps, was performed. The magnitude of the amperometric signals obtained for 10^{-5} µg mL⁻¹ ProtA at -0.15 V (vs the Ag pseudoreference electrode) after depositing 5 µL of a 3.5 mM H₂O₂ solution on the MBs suspension-TTF-Au/SPEs was taken as the criterion of selection for the working conditions. On the other hand, the experimental variables involved in the electrochemical detection step (H₂O₂ concentration, TTF loading and applied potential) were identical to those optimized previously for genosensors developed using Au/SPEs [47]. Table 1 summarizes the experimental variables checked, the ranges tested and the parameters selected for further work.

The effect of the ProtA-MBs loading on the amperometric signal showed an increase in the current up to 2.5 µL MBs solution (30 mg mL⁻¹), after which the response practically levelled off. A value of 5.0 µL, where a lower variability in the amperometric signals ($n=3$) was observed, was chosen for further studies.

The concentration of the capture antibody was optimized in the 10 – 40 µg mL⁻¹ range. Figure 2a shows as the measured current increased with the capture antibody concentration up to 20 µg mL⁻¹, with a significant decrease for larger concentrations. This effect can be attributed to high capture antibody loadings on the MBs hindering the access of ProtA to the binding sites of the immobilized antibodies.

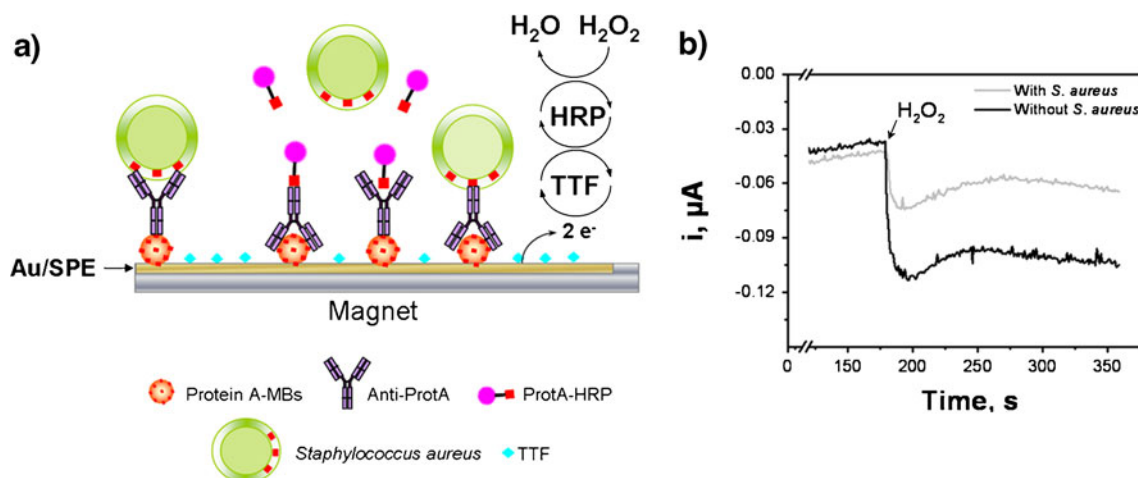


Fig. 1 Schematic display of the developed *S. aureus* magnetoimmunosensor (a), and amperometric detection of the mediated reduction of H₂O₂ with TTF (b) in the absence and presence of 10^5 cfu mL⁻¹ *S. aureus*

Table 1 Optimization of experimental variables

Experimental variable	Checked range	Selected value
$V_{\text{proteinA-MBs}}$, μL	1–10	5
$[\text{antiProtA}]$, $\mu\text{g mL}^{-1}$	10–40	20
$V_{\text{antiProtA}}$, μL	50–200	100
$t_{\text{antiProtA}}$, min	15–60	30
$V_{\text{ProtA/S. aureus}}$, μL	20–200	50
$t_{\text{ProtA/S. aureus}}$, min	15–60	30
$[\text{ProtA-HRP}]$, $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.05–1	0.5
$V_{\text{ProtA-HRP}}$, μL	50–200	200
$t_{\text{ProtA-HRP}}$, min	15–60	30

Consequently, in further work, a $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ antiProtA solution was always used for the preparation of the anti-ProtA–ProtA-modified MBs.

The effect of the labelled antigen concentration on the amperometric signal was also checked, between 0.05 and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$. The current increased with the ProtA-HRP concentration up to $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and then decreased for higher concentrations (Fig. 2b). Therefore, $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ProtA-HRP was selected for further work.

The effect of the incubation time in the three different incubation steps performed, i.e., ProtA-MBs with capture antibody, MBs-capture antibody conjugate with ProtA, and MBs-capture antibody-ProtA with labelled antigen, was also evaluated. The best amperometric responses were obtained for 30 min incubation in the three steps. As expected, considering that an increase in the ProtA present in the sample produced a decrease in the amount of ProtA-HRP attached to the modified MBs surface longer incubation times in the analyte solution gave rise to lower amperometric signals. It is worth to remark that it was possible to identify ProtA in less than 2 h. Finally, 100 μL of the capture antibody solution, 200 μL of the detection antibody

solution, and 50 μL of the antigen solution were chosen as optimum conditions.

Analytical characteristics of the developed magnetoimmunosensor

Once the variables involved in the immunoassay procedure and in the immunosensor preparation were selected, a calibration graph for ProtA was constructed (Fig. 3), this depicting the expected shape for a competitive format. The IC_{50} value corresponded to $2.1 \times 10^{-7} \mu\text{g mL}^{-1}$, and the limit of detection, calculated as the analyte concentration for which the tracer binding to the antibody was inhibited by 10%, was $3.9 \times 10^{-9} \mu\text{g mL}^{-1}$. The magnetoimmunosensor showed a dynamic range (normalized signal in the 20–80% range) from 1.7×10^{-8} to $2.6 \times 10^{-6} \mu\text{g mL}^{-1}$. Table 2 compares the analytical performance of different ProtA and *S. aureus* electrochemical immunosensors, the limit of detection achieved in this work being considerably lower than those reported before for ProtA.

The obtained calibration curve for ProtA provided the basis for *S. aureus* determination. It has been previously reported [18–20], that the amount of ProtA expressed by *S. aureus* is proportional to the cell count in the sample. Consequently, calibration curves for *S. aureus*, expressed as the number of *S. aureus* attenuated and non-attenuated cells per milliliters, were also constructed. Table 3 summarizes the characteristics obtained for these calibration graphs. As it can be seen, similar analytical characteristics were obtained for both types of cells, although they were slightly better for attenuated cells. This can be explained by the fact that attenuated cells are obtained through a thermal treatment which liberates ProtA increasing the accessibility to the antibody [19], and also taking into account that the commercial attenuated cells used for this assay were *S. aureus* Cowan I strain cells, which are the ones with more ProtA in their cellular wall. However, considering that real samples should contain non-attenuated cells, these

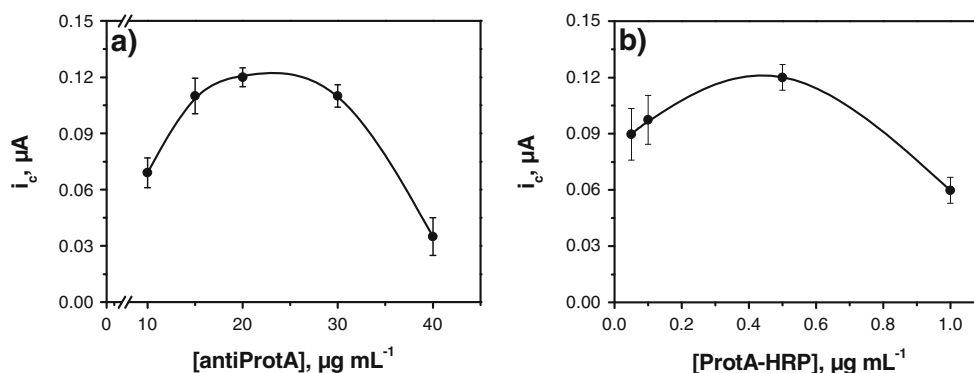


Fig. 2 Amperometric response measured for 0.35 mM hydrogen peroxide as a function of antiProtA (a), and ProtA-HRP (b) concentration. Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; TTF loading, 2.5 μmol ; ProtA-MBs, 5 μL (30 mg mL^{-1}); antiProtA,

20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b); ProtA-HRP, 0.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (a); ProtA, $10^{-5} \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{inc}}=30$ min, $V_{\text{inc}}=100 \mu\text{L}$; $E_{\text{app}}=-0.15$ V vs Ag pseudoreference electrode. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$)

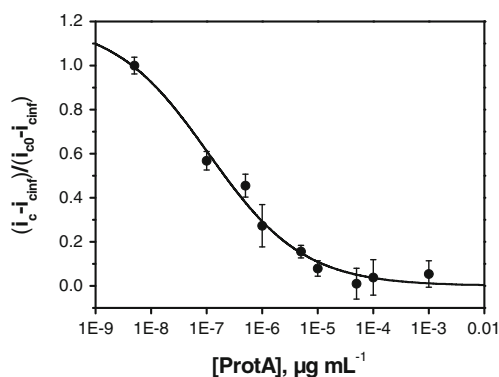


Fig. 3 Calibration curve obtained for ProtA using the developed competitive magnetosensor in the optimal conditions described in Table 1

were used for further studies. The limit of detection achieved for non-attenuated cells, 0.27 cfu mL^{-1} , was three orders of magnitude lower than that obtained in a previous work using an immunosensor based on DTSP-SAM-modified Au/SPEs on where RbIgG and HRP-labelled antigens were co-immobilized [27]. Moreover, it was reported that the sensitivity can be improved by subjecting bacteria cells to wall lyses in order to increase the availability of ProtA-bearing cell portions and their diffusion towards the antibodies immobilized on the MBs. Therefore, sonication, following the procedure described in the Experimental Section, was employed to partially extract ProtA from de *S. aureus* cells walls [19]. The treated cells were subsequently immobilized using the same procedure as that for non-treated cells. As expected, the limit of detection was enhanced by one order of magnitude when compared to that obtained without lyses treatment. On the other hand, it must be noted that in all cases the limits of detection obtained were below 1 cfu mL^{-1} , which can be attributed to the fact that we are really detecting ProtA which is liberated from the cells wall even without any lyses treatment. The content of ProtA in *S. aureus* cells, as reported in literature [48] is $\leq 0.16 \text{ ng}/10^6$ bacteria for ProtA poor strains and $\geq 0.625 \text{ ng}/10^6$ bacteria for ProtA-rich strains.

In general, it can be claimed that the magnetosensor presented here has relevant advantages. Not only shows the lowest limit of detection reported till now for ProtA but also for *S. aureus*. Moreover, apart from the much lower detection limit achieved (more than 370-fold lower than the smallest reported value for *S. aureus* [27]), the total time required for the assay (2 h) compares advantageously with other immuno-approaches described in the literature for the detection of this microorganism. The results presented in our study demonstrate the potential of this magnetosensor for determination of whole cells by capturing the target analyte via specific antibodies towards specific components of its cellular membrane.

Selectivity of the developed immunosensor

The most commonly involved foodborne pathogens originating from milk are *Brucella* sp., *S. aureus*, *E. coli* and *Salmonella* sp. [49]. For this reason, the selectivity of the immunosensors against *E. coli* and *S. choleraesuis* was evaluated by checking the amperometric responses at the same concentration level than that of *S. aureus* over the $1.0\text{--}1.0 \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$ range, under the experimental conditions selected above. Figure 4 shows the amperometric responses obtained with the different bacteria at each concentration level. As can be seen, unlike what happens with the target bacteria, no significant decrease in the response was observed with increasing concentrations of *E. coli* and *S. choleraesuis*, indicating that there was no significant cross-reaction of the immunosensor with other bacterial species. These results demonstrated that the interaction between the antibody and the ProtA of the target *S. aureus* cells is solely responsible of the diminution of the amperometric signal observed due to the competition with the Prot A-HRP for the capture antibody, therefore showing the specificity of the immunosensor for *S. aureus*.

Application to the analysis of inoculated milk samples

S. aureus is very often isolated from the excretion of the mammary gland of milk producing animals as well as from milk tanks. Since milk is an excellent substrate for the growth of *S. aureus*, and along with other dairy products, it represents a source of foodborne diseases [50], the usefulness of the amperometric magnetosensor for the analysis of real samples was demonstrated by analyzing inoculated semi-skimmed milk samples. Milk samples not containing bacteria were inoculated at two *S. aureus* concentration levels, 10 and 100 cfu mL^{-1} . The samples were subjected to the ultrasonication cell lyses procedure described in the “Experimental” section. This procedure, apart from releasing ProtA from *S. aureus* cells, inactivates lactoperoxidase contained in bovine milk [51]. Thereafter, a calibration graph for *S. aureus* cells in undiluted and untreated milk was constructed over the $1.0\text{--}1.0 \times 10^7 \text{ cfu mL}^{-1}$ concentration range following the same methodology described for standard solutions (see Fig. 5). As can be seen, the direct *S. aureus* determination in raw milk, with no need for dilution or sample treatment, is feasible.

The estimated limit of detection in raw milk, according to the criterion described above, was only 1 cfu mL^{-1} . Therefore, the determination of *S. aureus* in inoculated milk samples was accomplished by interpolation of the current values into the calibration plot obtained with *S. aureus* in the matrix sample. Analysis of six milk samples at both inoculation levels, yielded *S. aureus* mean contents of (11.2 ± 0.9) and $(106 \pm 8) \text{ cfu mL}^{-1}$, respectively, the confidence interval

Table 2 Analytical performance of different *S. aureus* and Prot A electrochemical immunosensors and immunoassays reported in the literature

Method	Technique	Sample	Linear range	Limit of detection	Assay time ^a	References
Enzymatic (AP) immunoassay	DPV	–	–	1×10^3 cfu mL ⁻¹	~3 h	[12]
Enzymatic (AP) immunoassay	Amperometry ($E_{app} = +0.87$ V vs. Ag/AgCl)	Milk and beef	1.0×10^3 – 1.0×10^7 cfu mL ⁻¹	$>10^3$ cfu mL ⁻¹	16 h 15 min	[18]
Enzymatic (catalase) immunoassay	Amperometry ($E_{app} = -0.50$ V vs. Ag/AgCl)	Braising steak, skimmed milk and Cheddar cheese	Pure cultures: 1.0×10^3 – 1.0×10^4 cfu mL ⁻¹	Prot A: 0.1 ng mL ⁻¹ (2.4×10^{-12} M) <i>S. aureus</i> : pure cultures: $>10^5$ cfu g ⁻¹ Food: $>10^4$ cfu mL ⁻¹ 1 cfu g ⁻¹ after 18 h enrichment $>10^4$ cfu mL ⁻¹	~15 h	[19]
Enzymatic (AP) immunoassay	Amperometry ($E_{app} = +0.85$ V vs. Ag/AgCl)	Milk, cheese, beef and chicken	1.0×10^4 – 1.0×10^7 cells mL ⁻¹	$>10^4$ cfu mL ⁻¹	5 h 15 min	[20]
Immunosensor with co-immobilization of GOD and RbIgG. HRP-labelled RbIgG Highly dispersed immunosorbent acting as a immunoelectrode	Amperometry ($E_{app} = 0.00$ V vs. Ag/AgCl)	–	1.0×10^3 – 1.0×10^6 cells mL ⁻¹	10^3 cells mL ⁻¹	21.5 h	[21]
Immunosensor using MPA-modified electrodes and HRP as the enzyme label	Amperometry ($E_{app} = -0.15$ V vs. Ag/AgCl)	–	10^{-10} M to 10^{-5} M	1 nM	22 min	[52]
Integrated immunosensor using a Tyr-MPA-modified electrode	Amperometry ($E_{app} = 0.00$ V vs. Ag pseudo reference electrode)	–	2.2×10^5 – 9.2×10^5 cells mL ⁻¹	1.6×10^5 cells mL ⁻¹	~16.5 h	[25]
Integrated immunosensor using a DTSP-modified Au/SPE	Amperometry ($E_{app} = -0.15$ V vs. Ag/AgCl)	–	4.4×10^5 – 1.8×10^7 cells mL ⁻¹ 4.0×10^3 – 4.6×10^4 cells mL ^{-1a}	1.7×10^5 cells mL ⁻¹ 2.3×10^3 cells mL ^{-1b}	~16.5 h	[26]
Integrated immunosensor using a DTSP-modified Au/SPE	Amperometry ($E_{app} = 0.00$ V vs. Ag pseudo reference electrode)	Milk	1.3×10^3 – 7.6×10^4 cells mL ⁻¹	3.7×10^2 cells mL ⁻¹	~4 h	[27]
Gold electrode modified with HDT, AuNPs and IgG	EIS	–	Prot A: 5 – $1,000$ pg mL ⁻¹	Prot A: 1 pg mL ⁻¹	19 h	[29]
Competitive immunoassay using ProtA- HRP on antiProtA-modified MBs	Amperometry ($E_{app} = -0.15$ V vs. Ag pseudo ref. electrode)	Milk	1.0 – 1.0×10^7 cfu mL ⁻¹	Prot A: 3.9×10^{-9} µg mL ⁻¹ <i>S. aureus</i> : <1 cfu mL ⁻¹	~2 h	This work

AP alkaline phosphatase, AuE gold disc electrode, AuNPs gold nanoparticles, DPV differential pulse voltammetry, DTSP 3,3-dithiodipropionic acid di(N-succinimidyl ester), EIS electrochemical impedance spectroscopy, GOD glucose oxidase, HDT 1,6-hexanedithiol, IgG immunoglobulin G, RbIgG rabbit immunoglobulin G, HRP horseradish peroxidase, MB magnetic bead, MPA mercaptopropionic acid, Tyr tyrosine, SPE screen-printed electrode

^aTotal time including the preparation of the immunosensor

^b*S. aureus* cells subjected to wall lyses by heat treatment

Table 3 Analytical characteristics obtained for the determination of *S. aureus* cells

Parameter	Attenuated cells (no lyses)	Non-attenuated cells (no lyses)	Non-attenuated cells (with lyses)
IC ₅₀ , cfu mL ⁻¹	2.5×10 ²	3.6×10 ²	4.1×10 ²
Limit of detection, cfu mL ⁻¹	0.23	0.27	7.6×10 ⁻²
Dynamic range, cfu mL ⁻¹	3.1–1.6×10 ⁴	4.0–1.8×10 ⁴	1.0–1.0×10 ⁷
Reproducibility, %	2.2 (n=8) (10 cfu mL ⁻¹)	4.7 (n=9) (10 cfu mL ⁻¹)	5.3 (n=6) (1.0×10 ² cfu mL ⁻¹)

having been calculated for $\alpha=0.05$. Mean recoveries of 112 ± 10 and $106\pm 8\%$, respectively, were obtained, which, taking into account the type of analysis carried out, can be considered as very good results, thus showing fairly well the usefulness of the magnetoimmunosensor for the determination of very low *S. aureus* concentrations in milk samples without sample treatment, in a total time for the assay of approximately 2 h. Given that the maximum acceptable levels legislated for *S. aureus* in some foodstuffs are lower than 10^3 cfu mL⁻¹ (absence, 10 or 10^2 cfu g⁻¹, depending on the nature of the foodstuff [30]), the low limit of detection achieved in raw milk samples demonstrated the suitability of the developed magnetoimmunosensor for food quality control without pre-concentration or pre-enrichment steps. Moreover, the range of linearity, covering seven orders of magnitude (see Table 3 and Fig. 5) obtained also in inoculated milk samples demonstrated the suitability of the developed magnetoimmunosensor to detect the target microorganism in very little or heavily contaminated samples.

It is worth to also mention here that although this immunosensor system will not be able to detect *S. aureus* strains that lack ProtA, the use of this target antigen allows the detection of the pathogen independently of its viability. *S. aureus* can be destroyed during pasteurization but this specific cell wall protein is heat-resistant and maintains its biological properties

offering the possibility to detect foodborne intoxication by this microorganism even in pasteurized materials.

Conclusions

In this work, a disposable magnetoimmunosensor based on the use of protein A as the target antigen has been developed. This magnetoimmunosensor is able to detect *S. aureus* and this species-specific antigen by coupling functionalized magnetic beads, a direct competitive immunoassay with ProtA-HRP and amperometric transduction at Au/SPEs. The described results demonstrate the ability of this magnetoimmunosensor to detect and quantify low levels of ProtA-bearing *S. aureus* cells reliably, specifically, rapidly, independently of their viability in pure cultures and, moreover, directly in raw food samples like milk. The low limit of detection achieved, of as few as 1 cfu per mL of undiluted and untreated milk samples, without pre-concentration or pre-enrichment steps, is three orders of magnitude lower than the maximum allowed level for *S. aureus* in food. The great exhibited performance, remarkably better than those reported for other previous electrochemical immunosensor designs described in the literature, together with the use of disposable mass-produced sensors, make the developed magnetoimmunosensor a useful and affordable analytical tool for a broad spectrum of applications. Moreover, the simplicity, and easy automation and miniaturization of the required instrumentation make feasible its use as

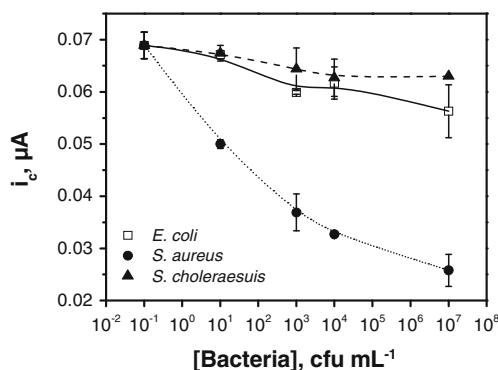


Fig. 4 Immunosensors specificity towards *S. aureus*. Other experimental conditions: [AntiProtA]=20 μg mL⁻¹; incubation time in the cells solution, 30 min; [ProtA-HRP]=0.5 μg mL⁻¹; incubation time in the ProtA-HRP solution, 30 min. Background solution, 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0). $E_{app}=-0.15$ V vs. the Ag pseudoreference electrode

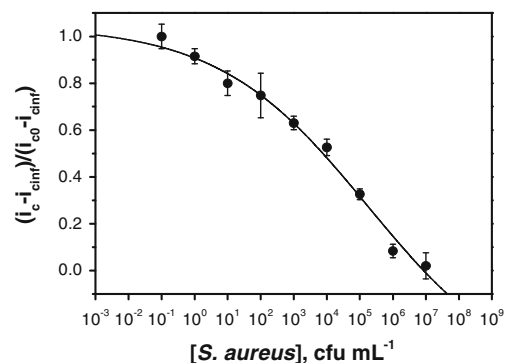


Fig. 5 Calibration curves for *S. aureus* (with cell lyses treatment) obtained in inoculated semi-skimmed milk samples. Other conditions as in Fig. 3

an alternative food quality control or clinical diagnosis tool in laboratory and in the development of devices for on-site analysis.

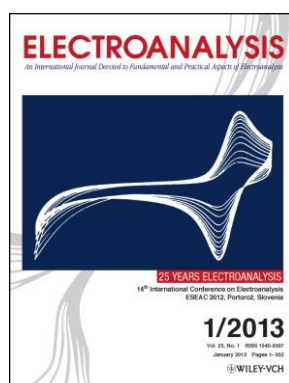
Acknowledgements The financial support of the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación Research Project CTQ2009-09351BQU, and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. B. Esteban-Fernández de Ávila acknowledges a FPI fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

References

- Huang SJ, Wang YJ, Cai QY, Fang JD (2010) Chin J Anal Chem 38:105–108
- Fridkin SK, Hageman JC, Morrison M, Sanza LT, Como-Sabetti K, Jernigan JA, Harriman K, Harrison LH, Lynfield R, Farley MM (2005) N Engl J Med 352:1436–1444
- Torres VJ, Stauff DL, Pishchany G, Bezradica JS, Gordy LE, Iturregui J, Anderson KL, Dunman PM, Joyce S, Skaar EP (2007) Cell Host Microbe 1:109–119
- Huang S, Ge S, He L, Cai Q, Grimes CA (2008) Biosens Bioelectron 23:1745–1748
- Nelles MJ, Niswander CA, Karakawa WW, Vann WF, Arbeit RD (1985) Infect Immun 49:14–18
- Huang SH (2007) Sens Actuators B 127:335–340
- Boujday S, Briandet R, Salmain M, Herry JM, Marnet PG, Gautier M, Pradier CM (2008) Microchim Acta 163:203–209
- McKillip JL, Drake M (2004) J Food Prot 67:823–832
- Brett MM (1998) J Appl Microbiol Symp Suppl 84:110S–119S
- Hughes D, Dailianis A, Hill L (1999) J AOAC Int 82:1171–1174
- Bennett RW (2005) J Food Prot 68:1264–1270
- Delibato E, Bancone M, Volpe G, De Medici D, Moscone D, Palleschi G (2005) Anal Lett 38:1569–1586
- Lancette GA, Tatini SR (1990) In: Vanderzant C, Splittstoesser DF (eds) Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd edn. American Public Health Association, Washington DC
- Bennett RW, Lancette GA (1992) Bacteriological analytical manual, 7th edn. Association of Official Analytical Chemists, Arlington
- Forsgren A (1970) Infect Immun 2:672–673
- Movitz J (1976) Eur J Biochem 68:291–299
- Duggleby CJ, Jones SA (1983) Nucleic Acid Res 11:3065–3076
- Mirhabibollahi B, Brooks JL, Kroll RG (1990) Lett Appl Microbiol 11:119–122
- Mirhabibollahi B, Brooks JL, Kroll RG (1990) J Appl Bacteriol 68:577–585
- Mirhabibollahi B, Brooks JL, Kroll RG (1990) Appl Microbiol Biotechnol 34:242–247
- Rishpon J, Ivnitski D (1997) Biosens Bioelectron 12:195–204
- Valat C, Limoges B, Huet D, Romette JL (2000) Anal Chim Acta 404:187–194
- Lee W, Oh BK, Bae YM, Paek SH, Lee WH, Choi JW (2003) Biosens Bioelectron 19:185–192
- Zacco E, Pividori MI, Llopis X, Del Valle M, Alegret S (2004) J Immunol Methods 286:35–46
- Escamilla-Gómez V, Campuzano S, Pedrero M, Pingarrón JM (2007) Electroanalysis 19:1476–1482
- Escamilla-Gómez V, Campuzano S, Pedrero M, Pingarrón JM (2008) Anal Bioanal Chem 391:837–845
- Escamilla-Gómez V, Campuzano S, Pedrero M, Pingarrón JM (2008) Talanta 77:876–881
- Le D, He F, Jiang TJ, Nie L, Yao S (1995) J Microbiol Methods 23:229–234
- Lin CC, Chen LC, Juang CH, Ding SJ, Chang CC, Chang HC (2008) J Electroanal Chem 619–620:39–45
- Le Loir Y, Baron F, Gautier M (2003) Genet Mol Res 2:63–76
- Moragas-Encuentra M, Pablo-Busto MB (2008) Recopilación de normas microbiológicas de los alimentos y asimilados y otros parámetros físico-químicos de interés sanitario. <http://www.eurocarne.com/informes/pdf/normas-microbiologicas.pdf>. Accessed 14 Oct 11
- Dziadkowiec D, Mansfield LP, Forsythe SJ (1995) Lett Appl Microbiol 20:361–364
- Van der Wolf JM, Hyman LJ, Jones DA, Grevesse C, van Beckhoven JR, van Vuurde JW, Perombelon MC (1996) J Appl Bacteriol 80:487–495
- Grant IR, Ball HJ, Rowe MT (1998) Appl Environ Microbiol 64:3153–3158
- Chen L, Deng L, Liu L, Peng Z (2007) Biosens Bioelectron 22:1487–1492
- Pedrero M, Campuzano S, Pingarrón JM (2012) Electroanal. doi:10.1002/elan.201100528, in press
- Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA (2003) Science 301:1884–1886
- Bange A, Halsall HB, Heineman WR (2005) Biosens Bioelectron 20:2488–2503
- Rosi NL, Mirkin CA (2005) Chem Rev 105:1547–1562
- Marquette CA, Blum LJ (2006) Biosens Bioelectron 21:1424–1433
- Willner I, Baron R, Willner B (2007) Biosens Bioelectron 22:1841–1852
- Zhang H, Cheng X, Richter M, Greene MI (2006) Nat Med 12:473–477
- Campuzano S, Esteban-Fernández de Ávila B, Yuste J, Pedrero M, García JL, García P, García E, Pingarrón JM (2010) Biosens Bioelectron 26:1225–1230
- Centi S, Laschi S, Mascini M (2007) Talanta 73:394–399
- Directive 2000/54/EC Protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work. Off J European Comm L 262/21–45
- Campuzano S, Pedrero M, Pingarrón JM (2005) Talanta 66:1310–1319
- Loaiza ÓA, Campuzano S, Pedrero M, Pividori MI, García P, Pingarrón JM (2008) Anal Chem 80:8239–8245
- Spika JS, Verbrugh HA, Verhoef J (1981) Infect Immun 34:455–460
- Brisabois A, Lafarge V, Brouillaud A, de Buyser ML, Collette C, Garin-Bastuji B, Thorel MF (1997) Rev Sci Tech 16:452–471
- Fotou K, Tzora A, Voidarou Ch, Alexopoulos A, Plessas S, Avgeris I, Bezirtoglou E, Akrida-Demertzi K, Demertzis PG (2011) Anaerobe 17:315–319
- Gebicka L, Gebicki JL (1997) J Enzym Inhib 12:133–141
- Abdel-Hamid I, Ghindilis AL, Atanasov P, Wilkins E (1997) Anal Lett 32:1081–1094

Disposable electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of troponin T cardiac marker

Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.;
Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M.



Vol. 25 p. 51–58, 2012

Disposable Electrochemical Magnetoimmunosensor for the Determination of Troponin T Cardiac Marker

Berta Esteban-Fernández de Ávila, Vanessa Escamilla-Gómez, Susana Campuzano, María Pedrero, José M. Pingarrón*

Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

*e-mail: pingarro@quim.ucm.es

Received: May 17, 2012

Accepted: June 14, 2012

Published online: August 6, 2012

Abstract

The preparation and performance of a disposable amperometric magnetoimmunosensor for the specific detection and quantification of human cardiac Troponin T is reported. The immunosensor design involves binding of streptavidin-magnetic beads to a specific biotinylated capture antibody and detection with a HRP-labeled antibody. The resulting modified-MBs are magnetically captured on the surface of a disposable gold screen-printed electrode and the amperometric response obtained at -0.10 V upon addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine and H_2O_2 is used to monitor the affinity reaction. This methodology achieves a detection limit of 0.017 ng mL^{-1} , a good selectivity and has been successfully tested with serum samples.

Keywords: Magnetoimmunosensor, Disposable magnetoimmunosensor, Amperometry, Troponin T, Serum

DOI: 10.1002/elan.201200250

1 Introduction

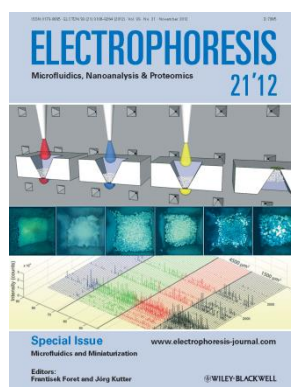
Cardiovascular diseases (CVDs) constitute one of the most prevalent and top-killer chronic disease and accounts for about half of the deaths in the western world [1,2]. Myocardial infarction (MI, the necrosis of cardiac myocytes following prolonged ischemia) causes irreversible damage to the heart. Then, a patient suspected of MI must be diagnosed as quickly, efficiently and reliably as possible [3]. Nowadays, this is accomplished by means of electrocardiograms and the measurement of those substances released into blood when the heart is damaged, which can be denominated as cardiac specific biomarkers.

Among the several cardiac biomarkers which have been identified for myocardial injury/necrosis, cardiac troponins have been recommended as the “gold standard” for the serological diagnosis and prognosis of acute myocardial infarction (AMI) because of their high sensitivity and specificity [4]. Cardiac troponins consist of a complex of troponin C (cTnC), I (cTnI) and T (cTnT) regulating the contraction of striated and cardiac muscle [2]. The complex dissociates with time in blood into free cTnT and I/C complex. Both cTnT and cTnI are recommended as the markers of choice because cTnC is unspecific. However, the existence of multiple forms of cTnI together with its low stability make the development of new analytical tools for its determination more difficult. Regarding cTnT, its levels in blood increase 2–4 h after the AMI symptoms, for which it cannot be regarded as a “very rapid” marker, and they remain abnormal for up to two weeks with the peak concentration closely correlated with the infarct size [4–7]. The methodologies currently used

for the determination of cTnT involve enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs), radioimmunoassays (RIAs), immunochromatographic tests, electrochemiluminescence immunoassays and surface plasmon resonance (SPR) [2]. Although the methodologies based on immune/antigen reactions are characterized by their selectivity, they also lack stability, imply long analysis times and high costs, and they are not portable also demanding skilled professionals. Consequently, the development of new tools minimizing limitations imposed by these methodologies and taking advantage of the high specificity of traditional immunochemical methods is of great interest. In this sense, research on the development of electrochemical cTnT sensors is lately increasing. Thus, a capacitive biosensor based on the increase of low frequency capacitance between two planar Al electrodes observed after antibody-antigen interaction, which was able to detect cTnT levels in the range from 0.07 to 6.83 ng mL^{-1} , has been described [8], Silva et al. [4] reported the incorporation of streptavidin polystyrene microspheres to the surface of screen-printed electrodes (SPEs) to achieve a *LOD* for cTnT of 0.2 ng mL^{-1} . Moreira et al. [2] synthesized a novel artificial antibody for cTnT by molecular imprint on the surface of multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) and included it into a PVC/plasticizer mixture coating a gold wire. A *LOD* of $0.16\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ was obtained and the sensor was tested in serum samples. A piezoelectric immunosensor for cTnT using gold nanoparticles (AuNPs) co-immobilized on a dithiol-modified surface, with a *LOD* of 0.0015 ng mL^{-1} , was described by Fonseca et al. [9]. Finally, an integrated chip for multi-

Design and fabrication of a COP-based microfluidic chip: chronoamperometric detection of troponin T

Del Campo, F.; Abad, L.; Muñoz, F.; Fernández, L.; Calavia, D.; Colom, G.; Salvador, J.; Marco, M.; Escamilla-Gómez, V.; Campuzano-Ruiz, S.; Esteban-Fernández de Ávila, B.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M.; Godino, N.; Gorkin III, R.; Ducrée J.



Vol. 33 p. 3187–3194, 2012

Llibertat Abad¹
 Francisco Javier del Campo¹
 Francesc Xavier Muñoz¹
 Luis J. Fernández^{2,3}
 Daniel Calavia⁴
 Gloria Colom^{3,5}
 Juan P. Salvador^{3,5}
 María Pilar Marco^{3,5}
 Vanessa Escamilla-Gómez⁶
 Berta Esteban-Fernández de
 Ávila⁶
 Susana Campuzano⁶
 María Pedrero⁶
 José M. Pingarrón⁶
 Neus Godino⁷
 Robert Gorkin III⁷
 Jens Ducreé⁷

¹Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

²Group of Structural Mechanics and Materials Modelling (GEMM-I3A), University of Zaragoza, Spain

³CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Spain

⁴Alphasip S. L., Zaragoza, Spain

⁵Applied Molecular Receptors Group (AMRg), IQAC-CSIC, Barcelona, Spain

⁶Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

⁷Biomedical Diagnostics Institute, National Centre for Sensor Research, School of Physical Sciences, Dublin City University, Dublin, Ireland

Received April 15, 2012

Revised June 26, 2012

Accepted June 27, 2012

1 Introduction

Cardiovascular diseases are among the main causes of death worldwide, followed by infectious and parasitic diseases, can-

Correspondence: Dr. Francisco Javier del Campo, Instituto de Microelectrónica de Barcelona, IMB-CNM (CSIC), Esfera UAB, Campus Universitat Autònoma de Barcelona, 08193– Bellaterra, Barcelona, Spain
E-mail: Javier.delcampo@csic.es
Fax: +34-93-580-14-96

Abbreviations: AMI, acute myocardial infarction; COP, cyclo-olefin polymer; ImE, immobilization electrode; HRP, horseradish peroxidase; MB, magnetic bead; TMB, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine; WE, working electrode

Research Article

Design and fabrication of a COP-based microfluidic chip: Chronoamperometric detection of Troponin T

This work demonstrates the design and fabrication of an all cyclo-olefin polymer based microfluidic device capable of capturing magnetic beads and performing electrochemical detection in a series of gold electrodes. The size of chip is of a microscope slide and features six independent measuring cells for multianalyte detection purposes. The aim of this work is to show that rapid prototyping techniques can be instrumental in the development of novel bioassays, particularly in clinical diagnosis applications. We show the successful determination of troponin-T, a cardiac disease marker, in the clinically relevant range of 0.05–1.0 ng/mL. This methodology achieves a detection limit of 0.017 ng/mL in PBS solutions, and is capable of detecting less than 1 ng/mL in a 1:50 human serum dilution.

Keywords:

Amperometry / Cyclo-olefin polymer / Immunomagnetic assay / Lab-on-a-chip / Troponin
 DOI 10.1002/elps.201200225

cer, and respiratory infections (WHO, http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/2012). This is the main reason of the high motivation in the development of new methodologies that facilitate the diagnosis through cardiac biomarker measurements. Correct risk stratification and treatment of acute myocardial infarction (AMI) and acute coronary syndrome rely heavily on the availability of rapid diagnosis methods.

The National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) Laboratory Medicine Practice Guidelines together with the European Society of Cardiology (ESC) guidelines recommend the monitoring of troponins in conjunction with patient's

Colour Online: See the article online to view Figs. 1, 3 and 4 in colour.

Disposable amperometric magnetoimmunosensor for the sensitive detection of the cardiac biomarker amino- terminal pro-B-type natriuretic peptide in human serum

Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.;
Campuzano, S.; Pedrero, M.; Pingarrón, J. M.



Vol. 784 p. 18–24, 2013



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/authorsrights>



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aca

Disposable amperometric magnetoimmunosensor for the sensitive detection of the cardiac biomarker amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in human serum

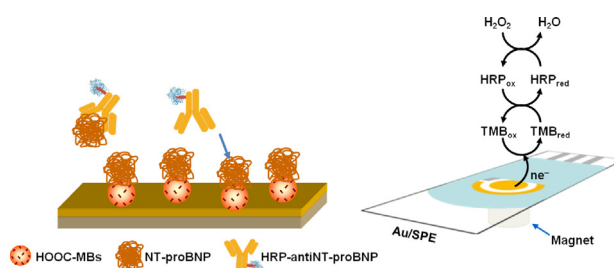
Berta Esteban-Fernández de Ávila, Vanessa Escamilla-Gómez, Susana Campuzano, María Pedrero, José M. Pingarrón*

Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain¹

HIGHLIGHTS

- Novel and sensitive amperometric magnetoimmunosensor for NT-proBNP detection.
- Indirect competitive immunoassay onto HOOC-MBs and Au/SPEs as transducers.
- Excellent analytical performance at levels clinically relevant in human serum.
- Useful in clinical diagnosis and prognosis of cardiac diseases.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2013
Received in revised form 12 April 2013
Accepted 15 April 2013
Available online 29 April 2013

Keywords:

Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide
Amperometric magnetoimmunosensors
Magnetic beads
Human serum

ABSTRACT

A novel amperometric magnetoimmunosensor using an indirect competitive format is developed for the sensitive detection of the amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP). The immunosensor design involves the covalent immobilization of the antigen onto carboxylic-modified magnetic beads (HOOC-MBs) activated with N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), and further incubation in a mixture solution containing variable concentrations of the antigen and a fixed concentration of an HRP-labeled detection antibody. Accordingly, the target NT-proBNP in the sample and that immobilized on the MBs compete for binding to a fixed amount of the specific HRP-labeled secondary antibody. The immunoconjugate-bearing MBs are captured by a magnet placed under the surface of a disposable gold screen-printed electrode (Au/SPE). The amperometric responses measured at -0.10 V (vs. a Ag pseudo-reference electrode), upon addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate, are used to monitor the affinity reaction. The developed magnetoimmunosensor provides attractive analytical characteristics in 10-times diluted human serum samples, exhibiting a linear range of clinical usefulness (0.12 – 42.9 ng mL⁻¹) and a detection limit of 0.02 ng mL⁻¹, which can be used in clinical diagnosis of chronic heart failure in the elderly and for classifying patients at risk of death after heart transplantation. The magnetoimmunosensor was successfully applied to the analysis of spiked human serum samples.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Heart failure has a great impact on health systems and society as a whole because of its incidence, prevalence, and high mortality rate, being the most common cause of hospitalization in people over 65 years of age [1,2]. The amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) is an important marker for heart failure

* Corresponding author. Tel.: +34 91 394 4315; fax: +34 91 394 29.
E-mail addresses: berta.efa@quim.ucm.es (B. Esteban-Fernández de Ávila),
vaneeg@quim.ucm.es (V. Escamilla-Gómez), susanacr@quim.ucm.es
(S. Campuzano), mpedrero@quim.ucm.es (M. Pedrero), pingarro@quim.ucm.es
(J.M. Pingarrón).

¹ Tel.: +34 91 394 4315; fax: +34 91 394 29.

that reflects ventricular volume expansion, ventricular overload and the degree of cardiac injury. This peptide plays important roles in the natriuretic, diuretic and vasodilator systems, as well as in the inhibition of the renin–angiotensin–aldosterone and the sympathetic nervous systems [3]. Elevation of plasma concentrations of NT-proBNP provides important diagnostic information for heart failure with a high sensitivity, and can also be used to evaluate the degree of severe cardiac dysfunction [4]. Moreover, it has been demonstrated that the concentration of NT-proBNP is also a useful diagnostic marker for rejection after heart transplantation, setting 1.0 ng mL^{-1} NT-proBNP as the potential cut-off value for classifying patients at risk of death after the first year post-transplantation [5]. Since its significant value in diagnosis and prognosis of cardiac diseases has been shown, NT-proBNP has been recommended as a diagnostic serum marker for heart failure [2].

Although several immunoassay methods, based on chemiluminescence detection and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) are currently available for the determination of NT-proBNP, they have certain inherent limitations: increased cost per assay, complicated wash procedures and sample preparation techniques, high detection times ranging from minutes for expensive advanced devices to the standard few hours, and difficult automation and miniaturization [3]. In this context, electrochemical immunosensors and immunoassays are envisaged as a valid alternative to classical methods of analysis for clinical biomarkers offering the advantages of being easy to use, rapid, robust and often inexpensive and capable of multianalyte testing using easily automated instrumentation [6]. Furthermore, electrochemical immunosensors can be used to facilitate point-of-care testing (POCT) and to undertake molecular analysis without the need for state-of-the-art laboratories [7]. Indeed, recently, some electrochemical immunosensors have been developed for the determination of NT-proBNP involving sandwich formats. Capture antibodies were immobilized on nanostructured gold and carbon nanotubes composite platforms and bioconjugates of gold nanochains, while HRP-labeled secondary antibodies were employed for signal amplification [2]. Also, an immunoassay system based on a regeneration-free sandwich-type electrochemical immunosensor using avidin-modified magnetic nanoparticles, biotinylated capture antibodies, and detection antibodies labeled with a novel platinum and Prussian blue nanomaterial has recently been described [7]. Moreover, a regeneration-free electrochemical immunosensor with only a single antibody/antigen pair has been proposed for the detection of NT-proBNP in serum samples based on the use of a biotinylated Fab fragment of monoclonal antibodies specific to NT-proBNP and avidin-modified magnetic nanoparticles [3].

As can be seen, some of these electrochemical immunosensors are based on the use of magnetic nanoparticles [3,7]. Magnetic beads (MBs) are currently employed in the development of electrochemical sensors with the aim to improve their performance giving rise to enhanced sensitivities, faster affinity reactions kinetics as the beads are in suspension, and minimized matrix effects [8–16]. This type of magnetimmunoassays allows the analysis of complex samples with no need for pre-enrichment or purification steps due to the “extraction” of the target analyte from the complex matrix and the measurement of the electrochemical signal in a “clean” environment [12].

In this paper the development of an amperometric immunosensing design based on an indirect competitive format and on the use of Au/SPEs and HOOC-modified MBs (HOOC-MBs) is described for the first time for the determination of NT-proBNP. In this methodology the antigen, NT-proBNP, is immobilized on the HOOC-MBs previously activated with carbodiimide and succinimide derivatives, followed by a blocking step of the unreacted activated groups of the functionalized MBs with an

ethanolamine solution. The modified MBs are then incubated in a mixture solution containing a variable concentration of antigen and a fixed concentration of a specific HRP-labeled detection antibody. The electrochemical detection of the enzyme reaction product is carried out at a disposable Au/SPE using TMB as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. The magnetimmunosensor performance, in terms of stability, sensitivity, target protein accessible concentration range and selectivity has been evaluated. Finally, the usefulness of the developed disposable magnetimmunosensor has been successfully demonstrated by the analysis of spiked serum samples.

2. Experimental

2.1. Apparatus and electrodes

Amperometric measurements were carried out with an ECO Chemie Autolab PGSTAT 101 potentiostat using the software package NOVA 1.7. A P-Selecta (Scharlab) ultrasonic bath and an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Conecta S.A.) were also employed. Screen-printed Au electrodes (Au/SPEs, DRP-220AT, purchased from Dropsens) consisting of a 4-mm smooth Au working electrode, an Au counter electrode and an Ag pseudo-reference electrode, were used. Homogenization of the solutions was facilitated with a Bunsen AGT-9 Vortex. Magnetic separation steps for incubation/washing processes were performed using a Dynal MPC-S (product no. 120.20, Dynal Biotech ASA, Norway) magnetic particle concentrator. A neodymium magnet (AIMAN GZ) was used to control the attraction of the modified-MBs to the Au/SPE surface.

2.2. Reagents and solutions

Carboxylic acid-modified MBs (HOOC-MBs, $2.8 \mu\text{m}$, 10 mg mL^{-1} , Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid) were purchased from Dynal Biotech ASA. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), NaCl, KCl, Tween®20, sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, and Tris-HCl were purchased from Scharlab. N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) and ethanolamine were purchased from Sigma-Aldrich.

NT-proBNP (Cat 8NT2), peroxidase-conjugated mouse monoclonal antiNT-proBNP (HRP-antiNT-proBNP, Cat 4MT1C) and human cardiac troponin T (cTnT) (Cat 8T13) were purchased from Hytest Ltd. Progesterone-deficient human sera, (S7394), heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (H3149) and IgG from human serum (I4506) were purchased from Sigma. D-dimer (ab35949) from Abcam, bovine serum albumin (BSA-TYPE VH, 1066.0010) from Gerbu, and TMB- H_2O_2 K-Blue reagent solution from Neogen in a ready-to-use reagent format (K-Blue enhanced-activity substrate, also containing H_2O_2) were also used.

The following solutions, all prepared in deionized water, were also employed: phosphate-buffered saline (PBS) consisting of 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5; 0.025 M MES buffer, pH 5.0 (recommended by the supplier to activate the MBs and immobilize proteins); 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0, PBST) consisting of PBS with 0.05% Tween®20 (used for the antigen–antibody reaction), and 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.2 (used for the blocking washing step). A 1:1 EDC/sulfo-NHS mixture solution (50 mg mL^{-1} in MES buffer, pH 5.0) was used for the activation of the HOOC-MBs. The blocking step was carried out with a 0.1 M ethanolamine solution (prepared in a 0.1 M phosphate buffer solution, pH 8.0).

All chemicals used were of analytical-reagent grade, and deionized water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system ($18.2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

2.3. Modification of MBs

A 3 μL aliquot of the HOOC-MBs commercial suspension was transferred into a 1.5-mL eppendorf tube. Then, the MBs were washed twice with 50 μL MES buffer solution during 10 min under continuous stirring (600 rpm, 25 $^{\circ}\text{C}$). Between each step the particles were separated using the magnet and, after 4 min, the supernatant was discarded. The carboxylic groups of MBs were activated by 35 min incubation in 25 μL of the EDC/sulfo-NHS mixture solution. The activated MBs were washed twice with 50 μL of MES buffer and re-suspended in 25 μL of a 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP solution (in MES buffer). The NT-proBNP was captured onto the activated beads during 60 min at 25 $^{\circ}\text{C}$ under continuous stirring (600 rpm). Subsequently, the NT-proBNP-modified MBs were washed twice with 50 μL of MES buffer solution. Thereafter, the unreacted activated groups of the MBs were blocked by adding 25 μL of the ethanolamine solution and incubating the suspension under continuous stirring (600 rpm) for 60 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. After two washing steps with 50 μL of 0.1 M Tris-buffer (pH 7.4) and another one with 50 μL of PBST (pH 7.5), the NT-proBNP-coated MBs were re-suspended in 25 μL of a mixture solution containing a variable concentration of the free antigen and a fixed concentration of the HRP-antiNT-proBNP ($1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$) prepared in PBST buffer (pH 7.5). This mixture solution was prepared previously and allowed reacting for 30 min. Upon 45 min incubation at 25 $^{\circ}\text{C}$ under stirring (600 rpm), the resulting modified-MBs were washed twice with 50 μL of PBST buffer solution (pH 7.5).

Finally, the modified-MBs were re-suspended in 45 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) and immobilized on the Au/SPE surface by placing the neodymium magnet under the working electrode surface.

2.4. Amperometric measurements

Amperometric measurements were carried out at an applied potential of -0.10 V vs. the Ag pseudo-reference electrode. When the background current was stabilized, 5 μL of the TMB- H_2O_2 solution [16] were deposited on the working electrode surface and the resulting current was recorded. The signal used for analytical purposes was the current measured after 200 s of the TMB- H_2O_2 substrate addition.

Unless otherwise indicated, the reported data corresponded to the average of at least three replicates. A new Au/SPE was used for each measurement.

2.5. Analysis of serum samples

A calibration plot for NT-proBNP in this sample matrix was constructed by spiking 10 times-diluted human serum samples (in PBST, pH 7.5) with NT-proBNP concentrations ranging from 0.01 ng mL^{-1} to 5000 ng mL^{-1} . An adequate mixing of the antigen and serum was assured by placing the samples in a vortex. The NT-proBNP-modified MBs prepared as described in Section 2.3 were re-suspended in a 25- μL aliquot of a mixture solution containing the spiked diluted serum sample and $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ HRP-antiNT-proBNP and incubated at 25 $^{\circ}\text{C}$ for 45 min with vigorous shaking (600 rpm). The resulting MBs were washed, resuspended and magnetically captured on the working electrode surface following the same methodology described above for NT-proBNP standards solutions.

3. Results and discussion

The fundamentals of the immunosensor configuration as well as of the electrochemical transduction strategy are displayed in Fig. 1. Briefly, the NT-proBNP was covalently immobilized, with an EDC/sulfo-NHS mixture solution, onto the previously activated HOOC-MBs. After a blocking step with ethanolamine of the unreacted activated groups in the MBs, the NT-proBNP-MBs were incubated in the sample solution supplemented with the detection antibody. Thus, the immobilized NT-proBNP and the target NT-proBNP in the sample competed for binding a fixed amount of HRP-antiNT-proBNP antibody. MBs modified with the immuno-complexes were immobilized on top of the Au/SPE by means of a neodymium magnet placed under the working electrode surface and the biorecognition event was monitored upon addition of the TMB- H_2O_2 substrate. With this methodology, the Au/SPE only acted as the transducer of the recognition event while the immunoreactions occurred on the surface of the MBs.

3.1. Optimization of the working variables

All the experimental variables involved in the magnetoimmunosensor functioning were optimized by taking the ratio between the current values measured at -0.10 V (vs. Ag pseudo-reference electrode) in the absence (i_0) and in the presence of $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP ($i_{0.2}$) as the selection criteria. This NT-proBNP concentration was selected as it allowed a clear observation of the occurring competitive process. All these optimization studies

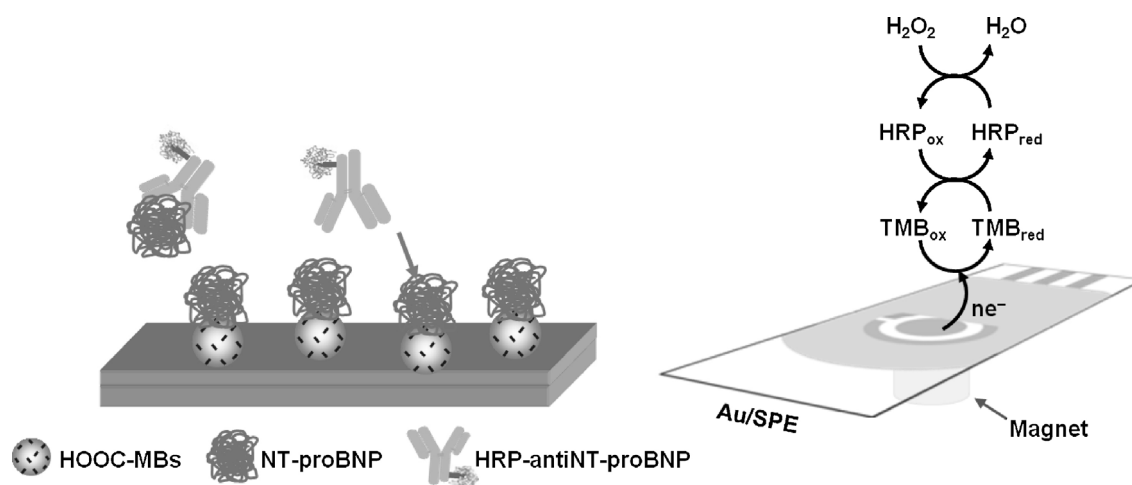


Fig. 1. Schematic display of the indirect competitive NT-proBNP magnetoimmunosensor developed and the enzyme and electrode reactions involved in the amperometric detection of the mediated reduction of H_2O_2 with TMB at the Au/SPE.

Table 1

Optimization of the different experimental variables involved in the preparation of the electrochemical magnetoimmunosensor for NT-proBNP.

Experimental variable	Tested range	Selected values
NT-proBNP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0–25	5
HRP-antiNT-proBNP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	0.5–2	1
V_{MBs} (μL)	2–6	3
$t_{\text{NT-proBNP}}$ (min)	15–120	60
t_{inc} (min) ^a	15–60	30
$t_{\text{competition}}$ (min)	15–60	45
$V_{\text{TMB-H}_2\text{O}_2}$ (μL)	1–10	5

^a Sample/HRP-antiNT-proBNP incubation time.

were made in phosphate buffer of pH 7.0 and with the working protocol described in Section 2.4. Table 1 summarizes the selected values for the different experimental variables considered (concentration of immobilized NT-proBNP, concentration of the enzyme-labeled detection antibody, volume of functionalized MBs, time for NT-proBNP capturing onto the MBs, incubation time between NT-proBNP in the sample and HRP-antiNT-proBNP, and competition time between the immobilized NT-proBNP and the analyte for binding the HRP-antiNT-proBNP antibody).

As an example of this type of studies, Fig. 2 shows the results obtained for the optimization of the NT-proBNP loading on the activated MBs (Fig. 2a) and the volume of the HOOC-MBs suspension (Fig. 2b). As it was expected, the ratio $i_0/i_{0.2}$ increased with the NT-proBNP concentration reaching a maximum value at $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ and showing a slight decrease for higher loadings, which can be attributed to a sterically hindered binding of the antibody and a lower competition, as well as to a possible increase in the electron transfer resistance when high concentrations of immobilized antigen were employed. Accordingly, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP were chosen for further studies. On the other hand, Fig. 2b shows as an increase in the HOOC-MBs suspension volume and consequently in the MBs loading increased the $i_0/i_{0.2}$ ratio up to $3 \mu\text{L}$. Higher volumes provoked a noticeable decrease in the ratio values most likely because of a higher electron transfer resistance occurring for large modified-MBs loadings [17].

The concentration of the HRP-antiNT-proBNP was optimized in the $0.5\text{--}2 \mu\text{g mL}^{-1}$ range (data not shown). The $i_0/i_{0.2}$ ratio increased with the antibody concentration up to $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ showing a decrease for larger values most likely due to a less favorable competitive process in the presence of antibody concentrations higher than the saturation concentration [18]. Consequently, $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ HRP-antiNT-proBNP was selected to evaluate the analytical characteristics of the magnetoimmunosensor.

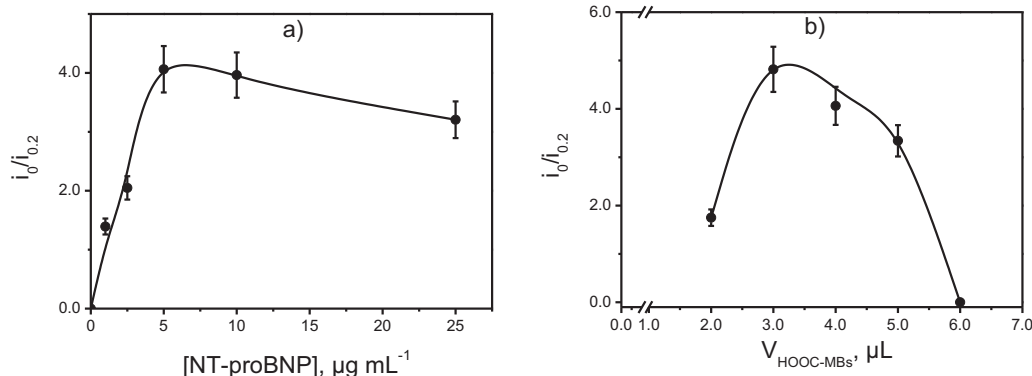


Fig. 2. Effect of the NT-proBNP concentration immobilized on the activated HOOC-MBs (a), and of the HOOC-MBs suspension volume (b) on the current ratio values calculated from the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 0.0 and $0.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP ($i_0/i_{0.2}$). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; [HRP-antiNT-proBNP]: $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, $V_{\text{inc}} = 25 \mu\text{L}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs. Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: $V_{\text{MBs}} = 3 \mu\text{L}$, $t_{\text{competition}} = 45 \text{ min}$ in (a); [NT-proBNP]_{immobilized}: $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{competition}} = 60 \text{ min}$ in (b). Error bars calculated as triple of the standard deviation ($n = 3$).

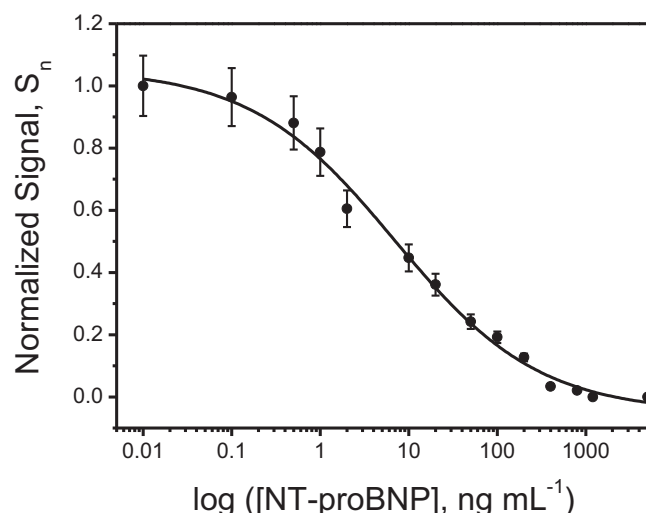


Fig. 3. Calibration curve constructed for NT-proBNP in PBST. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$). Experimental conditions as described in Table 1 (selected values column).

The graphs showing the experimental results for the rest of the variables optimized are included as electronic supplementary material.

3.2. Analytical characteristics

Under the optimized experimental conditions, a calibration curve for NT-proBNP was constructed in PBST (Fig. 3). The obtained amperometric responses were normalized according to:

$$S_n = \frac{i - i_\infty}{i_0 - i_\infty} \quad (1)$$

where i is the amperometric signal measured for a given analyte concentration, i_∞ is the current measured in the presence of an excess of NT-proBNP, and i_0 is the blank current in the absence of NT-proBNP. The calculated normalized signals (S_n) were plotted as a function of the analyte concentration (in ng mL^{-1} units and in logarithmic scale), and the experimental data were fitted to the following four-parameter logistic equation (sigmoidal):

$$S_n = \frac{i_{\text{max}} - i_{\text{min}}}{1 + (x/IC_{50})^h} + i_{\text{min}} \quad (2)$$

where x is the analyte concentration, i_{max} is the asymptotic maximum current in absence of analyte, h is the slope value at the

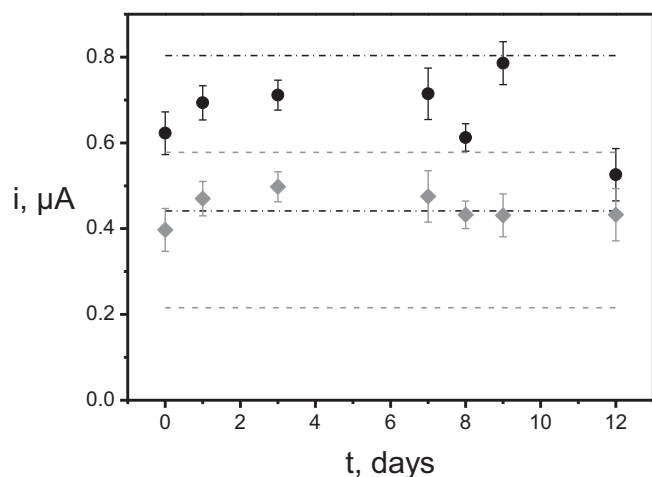


Fig. 4. Control charts constructed to check the storage stability of NT-proBNP-MBs stored in filtered PBST at 4 °C. Results are given in the form of the S_n values obtained for 7.5 ng mL⁻¹ NT-proBNP (gray dots and lines) and the amperometric signals obtained in absence of free NT-proBNP (black dots and lines). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

inflection point, IC_{50} is the analyte concentration at the inflection point (concentration giving 50% inhibition of i_{max}), and i_{min} is the asymptotic minimum current [19]. The IC_{50} corresponded to 7.43 ng mL⁻¹ and a dynamic range (DR) from 0.63 ng mL⁻¹ to 77.30 ng mL⁻¹ was calculated as the analyte concentration interval for which the amperometric signal was between 20% and 80% of the maximum signal. A limit of detection (LOD) of 0.21 ng mL⁻¹ was achieved, calculated as the analyte concentration for which the maximum amperometric signal was reduced by 10%.

The reproducibility of the amperometric responses obtained with different immunosensors constructed following the same protocol was evaluated by performing measurements for 7.5 ng mL⁻¹ NT-proBNP. The measured steady-state currents using 9 different immunosensors prepared on the same day yielded a relative standard deviation (RSD) value of 9.7%, thus showing that the magnetoimmunosensor fabrication procedure was reliable.

The developed methodology implies that the immunoreactions are carried out only on the MBs and not on the electrode surface. Therefore, the storage stability of the NT-proBNP-MBs conjugates, once the blocking step with ethanolamine is performed, was evaluated. NT-proBNP-MBs were stored at 4 °C in eppendorfs containing 50 μ L of filtered PBST. Each working day a couple of the prepared conjugates was incubated in a fresh solution of HRP-antiNT-proBNP or in a mixture of NT-proBNP (7.5 ng mL⁻¹) and HRP-antiNT-proBNP, according to the procedure described in Section 2. Fig. 4 shows the control charts constructed by setting as central values the mean values measured with 9 different immunosensors on the first day of the study and $\pm 3 \times$ the standard deviation of these values as the upper and lower control limits. As it can be observed, the NT-proBNP conjugates provided amperometric measurements inside the control limits during at least 12 days (no longer times were assayed) for both solutions tested indicating a good stability of the antigen-modified MBs. This result supports the possibility of preparing and storing the conjugates until the immunoassays are to be carried out, which would allow carrying the modified MBs to the place where samples would be taken and performing the determination of the target protein *in situ*.

3.3. Selectivity of the developed magnetoimmunosensor

Cross-reactivity from other non-target proteins (cTnT, BSA, IgG and D-dimer) at their concentrations commonly found in

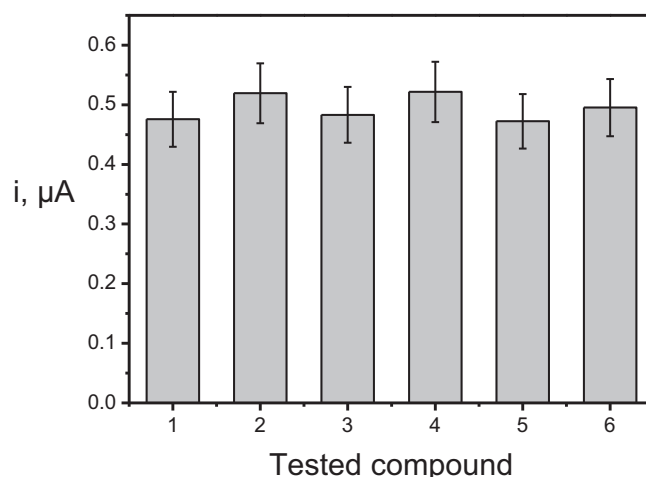


Fig. 5. Selectivity achieved with the NT-proBNP magnetoimmunosensor. Bars show the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 7.5 ng mL⁻¹ NT-proBNP in the absence (1) or in the presence of 0.5 ng mL⁻¹ cTnT (2), 0.5 mg mL⁻¹ BSA (3), 1.2 mg mL⁻¹ IgG (4), 4000 μ g mL⁻¹ heparin (5), and 0.5 μ g mL⁻¹ D-dimer (6). Experimental conditions as described in Table 1 (selected values column). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

serum or plasma samples (0.5 ng mL⁻¹ cTnT, 0.5 mg mL⁻¹ BSA, 1.2 mg mL⁻¹ IgG, and 0.5 μ g mL⁻¹ D-dimer) as well as from heparin (at 4000 μ g mL⁻¹) was checked. This was carried out by comparing the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 7.5 ng mL⁻¹ NT-proBNP (IC_{50} value) in the absence and in the presence of all the above-mentioned non-target compounds. The results are displayed in Fig. 5 showing that the presence of the other non-target proteins did not significantly affected the NT-proBNP binding at the considered concentration levels.

3.4. Application to the analysis of spiked human serum samples

The suitability of the magnetoimmunosensor for the determination of NT-proBNP in human serum was evaluated by analyzing samples containing no NT-proBNP and spiked with the target protein at three different concentration levels. A matrix effect was observed when undiluted serum was used because the obtained competition curve showed a much less pronounced sigmoid behavior. However, an acceptable calibration graph could be constructed for NT-proBNP in serum 10-times diluted with PBST, pH 7.5, solution (Fig. 6) allowing a DR between 0.12 and 42.9, an IC_{50} of 2.28, and a LOD of 0.02 ng mL⁻¹ to be obtained. It is important to remark that these analytical characteristics are remarkably improved with respect to those calculated with buffered standard solutions, which is most likely due to the effective *in situ* blocking of the remaining free activated HOOC-MBs sites produced by the serum components during the incubation step.

NT-proBNP cut-off levels are dependent on age and gender, being higher for women and the elderly. In general, these levels are stratified, in ng mL⁻¹, as <0.45 for age < 50, <0.90 for age 50–75, and <1.80 for age > 75 [20,21]. It has been demonstrated that most patients with raised NT-proBNP levels as well as almost all subjects with levels over four times the cut-off value have significant cardiovascular disease [22]. Moreover, cut-off values of 1.0 ng mL⁻¹ and 4.74 ng mL⁻¹ have been identified, respectively, for classifying patients at risk of death after one year of heart transplantation [5] as well as for risk stratification of pulmonary embolism (PE) [23]. Consequently, the developed magnetoimmunosensor, which achieves a LOD of 0.02 ng mL⁻¹ in 10 times-diluted human serum samples, can be envisaged as an useful analytical tool for the diagnosis of

Table 2

Results obtained in the determination of NT-proBNP in spiked human serum samples.

Concentration level (ng mL ⁻¹)	Found concentration (ng mL ⁻¹)	Mean recovery (%)	RSD (%)
0.10	0.11 ± 0.01	111 ± 12	8.8
0.50	0.54 ± 0.06	108 ± 12	8.8
2.0	2.1 ± 0.1	105 ± 6	5.0

Confidence intervals calculated for $n = 5$ and $\alpha = 0.05$.

chronic heart failure and for classifying patients at risk of PE and death after heart transplantation.

The determination of NT-proBNP in spiked serum samples was accomplished by interpolation of the measured current values

obtained for 10 times diluted samples spiked with NT-proBNP at three different concentration levels: 0.10, 0.50, and 2.0 ng mL⁻¹ into the calibration plot shown in Fig. 6. The results obtained in the analysis ($n = 5$) of the diluted human serum samples are summarized in Table 2, the confidence intervals being calculated for $\alpha = 0.05$. These results demonstrated the usefulness of the developed magnetoimmunosensor for the NT-proBNP determination in human serum despite the presence in the sample of high amounts of some proteins such as BSA or IgG with just an appropriate dilution with the working buffer as sample treatment. The developed methodology allows unequivocally detection of raised levels of NT-proBNP and quantification of the target protein in a total time for the assay of approximately 45 min (if the NT-proBNP-MBs are previously prepared for routine analysis).

Table 3

Analytical characteristics of different NT-proBNP immunosensors and immunoassays reported in the literature.

Methodology	Technique	Sample	Concentration range	LOD	Assay time ^a	Reference
Biotinylated Fab fragment of monoclonal antibodies specific to NT-proBNP detection using avidin functional magnetic nanoparticles.	Amperometric assay	Serum	0.04–2.5 ng mL ⁻¹	0.03 ng mL ⁻¹	–	[3]
Nanostructural gold and carbon nanotubes composite as immobilization platform and gold nanochains and HRP complex labeled secondary antibodies for signal amplification	Cyclic voltammetry (–0.5 to 0.5 V vs. SCE at 50 mV s ⁻¹)	–	0.02–100 ng mL ⁻¹	6 pg mL ⁻¹	120 min	[2]
Chip-based multiplexed assay for CRP and NT-proBNP	Fluorescence	Plasma	–	5 ng L ⁻¹	–	[24]
Immunosensor based on the nanostructural gold and carbon nanotubes composite as desirable platform for the capture antibodies immobilization AuNCs and HRP complex labeled secondary antibodies for signal amplification	LOCI®	Serum	5–130 pg mL ⁻¹	5 pg mL ⁻¹	–	[25]
Immunoassay based on an electrochemical immunosensor with magnetic nanoparticles, BAS and Fab antibodies using a microfluidic system	Amperometry ($E_{app} = 0.10$ V vs. Ag pseudo-reference electrode)	Whole blood samples	0.005–1.67 ng mL ⁻¹ 1.67–4 ng mL ⁻¹	0.003 ng mL ⁻¹	–	[7]
Fully automated lab-on-a-disk for multiplex immunoassay	Absorbance ($\lambda = 450$ nm)	Saliva and serum	0.86–69.3 ng mL ⁻¹ in saliva 0.70–36.0 ng mL ⁻¹ in serum	0.24 ng mL ⁻¹ in saliva 0.32 ng mL ⁻¹ in serum	6 h	[26]
A human CVD 4 plex panel 1 assay kit	Luminex technology (fluorescence)	Plasma	–	9.3 pg mL ⁻¹	–	[27]
ELISA sandwich	Absorbance ($\lambda = 450$ nm)	Plasma and cell culture supernatants	31.2–2000 pg mL ⁻¹	2 pg mL ⁻¹	3 h 30 min	[28]
ELISA sandwich	Absorbance ($\lambda = 450$ nm)	Serum, plasma, biological fluids	39.06–2500 pg mL ⁻¹	23.4 pg mL ⁻¹	3 h 25 min	[29]
ELISA sandwich	Absorbance ($\lambda = 450$ nm)	Serum or plasma	100–2000 pg mL ⁻¹	–	1 h 15 min	[30]
ELISA sandwich	Absorbance ($\lambda = 450$ nm)	Serum, plasma and other biological fluids	312–20,000 pg mL ⁻¹	78 pg mL ⁻¹	4 h 15 min	[31]
Indirect competitive magnetoimmunosensor involving the use of HOOC-MBs and Au/SPEs	Amperometry ($E_{app} = -0.10$ V vs. Ag pseudo-reference electrode)	Human serum	0.12–42.9 ng mL ⁻¹	0.02 ng mL ⁻¹	3 h 30 min	This work

AuNCs: gold nanochains; Au/SPEs: gold screen-printed carbon electrodes; BAS: biotin–avidin interaction; CRP: C-reactive protein; CVD: cardiovascular disease; HRP: horseradish peroxidase; LOCI®: luminescent oxygen channeling immunoassay; MBs: magnetic beads; and NT-proBNP: amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide.

^a Considering only the time required to carry out the corresponding immunological reaction and the detection step.

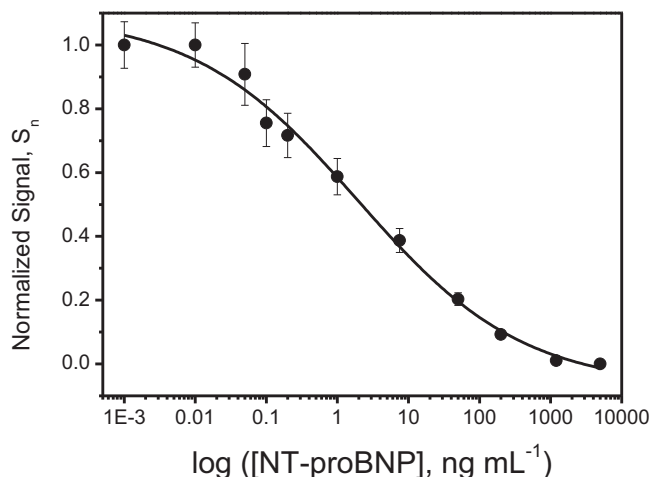


Fig. 6. Calibration curve for NT-proBNP constructed in 10-times diluted human serum. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$). Experimental conditions as described in Table 1 (selected values column).

Moreover, the analytical performance of the developed immunosensor was compared with those reported in the literature for other biosensors and with commercial ELISA kits available in the market for the determination of NT-proBNP (Table 3). As it can be seen, the achieved LOD is among the lowest reported using other electrochemical immunosensors and the magneto-immunosensor is more than appropriate for the clinical range of interest. Moreover, the approach involving the magnetoimmunosensor show important advantages related with the simplicity and much easier potential automation and miniaturization when compared with other sensitive electrochemical immunosensors described recently [2,7], which required complex and time consuming preparation protocols and are difficult to be implemented by unskilled personnel, which constitute important drawbacks for their consideration as suitable methodologies for POC diagnosis and prognosis.

On the other hand, the LOD achieved with the magnetoimmunosensor is similar or even better in some cases to the values claimed by the manufacturer for commercial ELISA kits. A valuable advantage is the remarkably shorter time needed for the assay considering only the time required to carry out the corresponding immunological reaction and the detection step in all cases. As it can be seen in Table 3, the methodology involved with the magneto-immunosensor required only 55 min (once the NT-proBNP-MBs are prepared and stored). Conversely, ELISA assays usually take more than 3 h.

4. Conclusions

The amperometric disposable magnetosensor developed making use of an indirect competitive immunoassay onto HOOC-MBs and Au/SPEs as electrochemical transducer, shows an excellent analytical performance for the determination of NT-proBNP at the concentration levels clinically relevant in human serum. Only a simple dilution with an appropriate buffer solution was needed as sample treatment. The usefulness of the magnetoimmunosensor was demonstrated by analyzing spiked human serum samples with good results. Moreover, the short analysis time required, the simplicity of the experimental procedure and the easy automation and miniaturization of the employed instrumentation make the developed magnetoimmunosensor a promising, attractive and user-friendly alternative diagnosis tool for the development of POC devices for onsite clinical diagnosis.

Acknowledgements

The financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Project, CTQ2012-34238, and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. A part of the work has been performed in the project 120215-CAJAL4EU, in which the Spanish partners are funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, and the ENIAC Joint Undertaking. B. Esteban-Fernández de Ávila acknowledges a FPI fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.039>.

References

- [1] W. Rosamond, K. Flegal, G. Friday, K. Furie, A. Go, K. Greenlund, N. Haase, M. Ho, V. Howard, B. Kissela, S. Kittner, D. Lloyd-Jones, M. McDermott, J. Meigs, C. Moy, G. Nichol, C.J. O'Donnell, V. Roger, J. Rumsfeld, P. Sorlie, J. Steinberger, T. Thom, S. Wasserthiel-Smoller, Y. Hong, Heart disease and stroke statistics—2007, *Circulation* 115 (2007) e69–e171.
- [2] Y. Zhuo, W. Yi, W. Lian, R. Yuan, Y. Chai, A. Chen, C. Hu, *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 2188–2193.
- [3] W. Yi, W. Liang, P. Li, S. Li, Z. Zhang, M. Yang, A. Chen, D. Zhang, C. Hu, *Biotechnol. Lett.* 33 (2011) 1539–1543.
- [4] T. Mueller, A. Gegenhuber, W. Poelz, M. Haltmayer, *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 (2004) 159–163.
- [5] N. Avello, B. Prieto, B.D. Molina, J.L. Rodríguez-Lambert, F.V. Álvarez, *Clin. Chim. Acta* 411 (2010) 161–166.
- [6] Q.A.M. Al-Khafaji, M. Harris, S. Tombelli, S. Laschi, A.P.F. Turner, M. Mascini, G. Marrazza, *Electroanalysis* 24 (2012) 735–742.
- [7] W. Liang, Y. Li, B. Zhang, Z. Zhang, A. Chen, D. Qi, W. Yi, C. Hua, *Biosens. Bioelectron.* 31 (2012) 480–485.
- [8] J.M. Nam, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin, *Science* 301 (2003) 1884–1886.
- [9] A. Bange, H.B. Halsall, W.R. Heineman, *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2488–2503.
- [10] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, *Chem. Rev.* 105 (2005) 1547–1562.
- [11] C.A. Marquette, L.J. Blum, *Biosens. Bioelectron.* 2 (2006) 1424–1433.
- [12] E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, M.P. Marco, *Anal. Chem.* 78 (2006) 1780–1788.
- [13] H. Zhang, X. Cheng, M. Richter, M.I. Greene, *Nat. Med.* 12 (2006) 473–477.
- [14] I. Willner, R. Baron, B. Willner, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 1841–1852.
- [15] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* 737 (2012) 29–36.
- [16] B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis* 25 (2013) 51–58.
- [17] O.A. Loaiza, S. Campuzano, M. Pedrero, M.I. Pividori, P. García, J.M. Pingarrón, *Anal. Chem.* 80 (2008) 8239–8245.
- [18] X.P. Liu, Y.J. Deng, X.Y. Jin, L.G. Chen, J.H. Jiang, G.L. Shen, R.Q. Yu, *Anal. Biochem.* 389 (2009) 63–68.
- [19] V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, *Electroanalysis* 19 (2007) 1476–1482.
- [20] H.N. Kim, J.L. Januzzi, *Circulation* 123 (2011) 2015–2019.
- [21] R.H.M. Salama, A.E.A.E. Moniem, N. El-Hefney, T. Samor, *Int. J. Clin. Med.* 2 (2011) 218–223.
- [22] G.I.W. Galasko, A. Lahiri, S.C. Barnes, P. Collinson, R. Senior, *Eur. Heart J.* 26 (2005) 2269–2276.
- [23] H. Dore, C. Fonseca, S. Leal, I. Rosário, J. Abecasis, J. Monge, M.J. Correia, L. Bronze, A. Leitão, I. Arroja, A. Aleixo, A. Silva, *Rev. Port. Cardiol.* 30 (2011) 881–886.
- [24] J. Melin, G. Rundström, C. Peterson, J. Bakker, B.D. MacCraith, M. Read, O. Öhman, C. Jönsson, *Anal. Biochem.* 409 (2011) 7–13.
- [25] D. Gruson, S.A. Ahn, T. Lepoutre, M.F. Rousseau, *Clin. Biochem.* 45 (2012) 171–174.
- [26] J. Park, V. Sunkara, T.-H. Kim, H. Hwang, Y.-K. Cho, *Anal. Chem.* 84 (2012) 2133–2140.
- [27] L.K. Lewis, S.D. Raudsepp, T.G. Yandle, C.M. Frampton, S.C. Palmer, R.W. Troughton, A.M. Richards, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 388–390.
- [28] Abnova, catalog number KA3099, last accessed April 2013. http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA3099
- [29] Antibodies, catalog number ABIN1116121, last accessed April 2013. <http://www.antibodies-online.com/kit/1116121/N-Terminal+Pro-Brain+Natriuretic+Peptide+NT-proBNP+ELISA/>
- [30] Biorbyt, catalog number orb54993, last accessed April 2013. <http://www.biorbyt.com/catalogsearch/result/?q=orb54993&x=0&y=0>
- [31] Eiaab, catalog number E0485h, last accessed April 2013. <http://www.eiaab.com/entries/detail/10020.EIAAB>

**DISPOSABLE AMPEROMETRIC MAGNETOIMMUNOSENSOR FOR THE
SENSITIVE DETECTION OF THE CARDIAC BIOMARKER AMINO-
TERMINAL PRO-B-TYPE NATRIURETIC PEPTIDE IN HUMAN SERUM**

Berta Esteban-Fernández de Ávila, Vanessa Escamilla-Gómez, Susana Campuzano,
María Pedrero, and José M. Pingarrón*

*Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad
Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.*

E-mails: berta.efa@quim.ucm.es, vaneeg@quim.ucm.es, susanacr@quim.ucm.es,
mpedrero@quim.ucm.es, pingarro@quim.ucm.es. Tel. 34 91 394 4315, fax 34 91 394 29

ELECTRONIC SUPPLEMENTARY MATERIAL

Results and discussion: optimization of the working variables

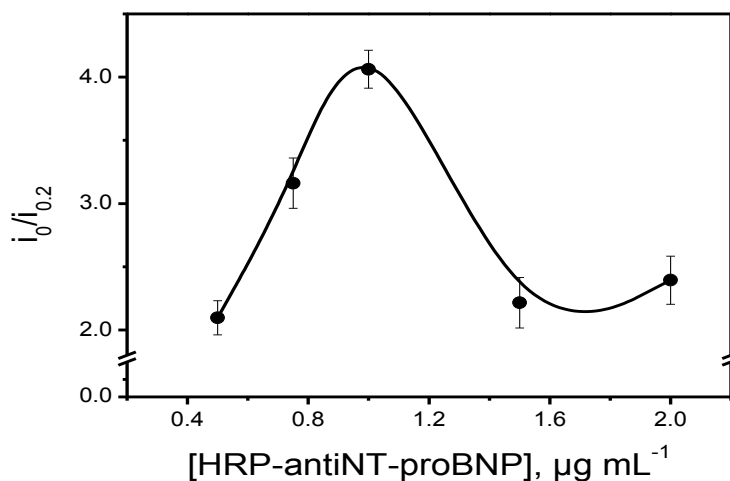


Fig. S1. Effect of the HRP-antiNT-proBNP concentration on the current ratio values calculated from the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 0.0 and 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP ($i_0/i_{0.2}$). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; $[\text{NT-proBNP}]_{\text{immobilized}} = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{NT-proBNP}} = 60 \text{ min}$, $V_{\text{inc}} = 25 \mu\text{L}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$; $t_{\text{NTproBNP}} = 60 \text{ min}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V vs Ag pseudo-reference electrode}$. Other conditions: $V_{\text{MBs}} = 3 \mu\text{L}$, $t_{\text{competition}} = 45 \text{ min}$. Error bars calculated as triple of the standard deviation (n=3).

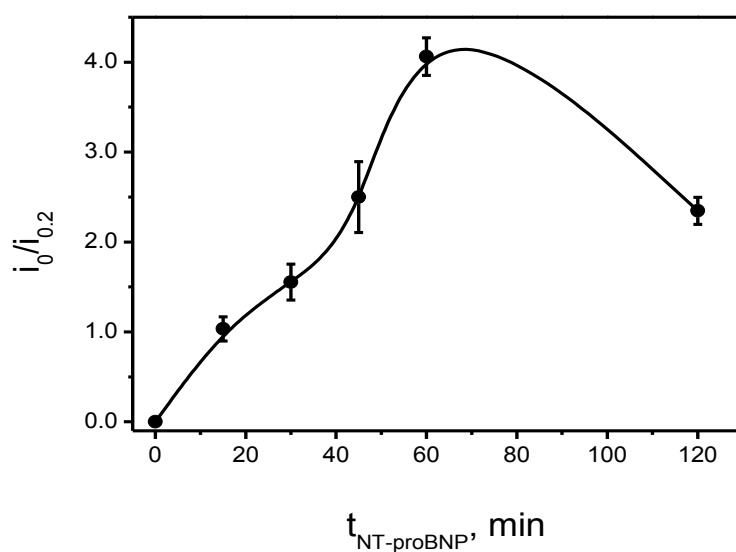


Fig. S2. Effect of the NT-proBNP immobilization time on the current ratio values calculated from the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 0.0 and 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP ($i_0/i_{0.2}$). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; $[\text{NT-proBNP}]_{\text{immobilized}} = 5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $V_{\text{inc}} = 25 \mu\text{L}$; $t_{\text{inc}} = 30 \text{ min}$; $[\text{HRP-antiNT-proBNP}] = 1 \mu\text{g mL}^{-1}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V vs Ag pseudo-reference electrode}$. Other conditions: $V_{\text{MBs}} = 3 \mu\text{L}$, $t_{\text{competition}} = 45 \text{ min}$. Error bars calculated as triple of the standard deviation ($n=3$).

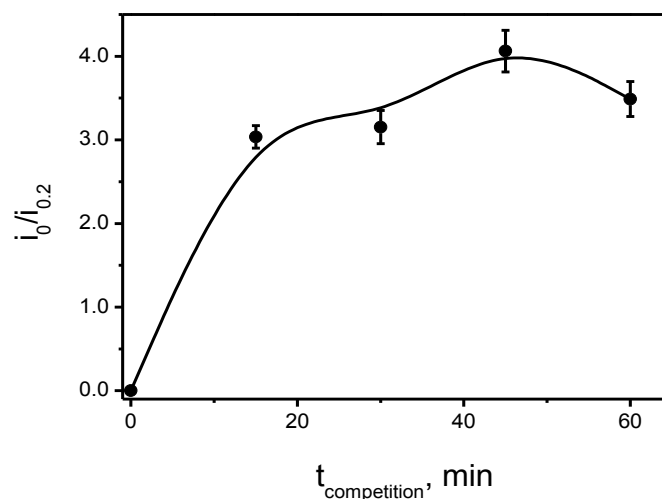


Fig. S3. Effect of the competition time between the immobilized NT-proBNP and the analyte for binding the HRP-antiNTproBNP antibody on the current ratio values calculated from the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 0.0 and 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP ($i_0/i_{0.2}$). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; [NT-proBNP]_{immobilized} = 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{NT-proBNP}}$ = 60 min, V_{inc} = 25 μL ; t_{inc} = 30 min; [HRP-antiNT-proBNP]: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E_{app} = - 0.10 V vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: V_{MBs} = 3 μL . Error bars calculated as triple of the standard deviation (n=3).

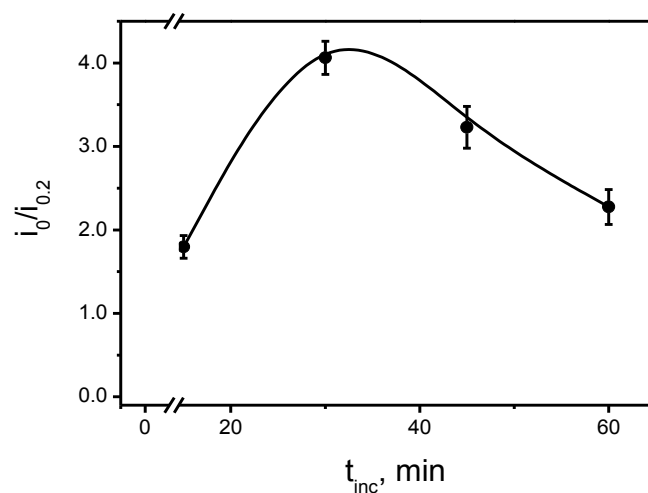


Fig. S4. Effect of the incubation time between NT-proBNP in the sample and HRP-antiNTproBNP antibody on the current ratio values calculated from the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 0.0 and 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP ($i_0/i_{0.2}$). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; [NT-proBNP]_{immobilized} = 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{NT-proBNP}}$ = 60 min, V_{inc} = 25 μL ; [HRP-antiNT-proBNP]: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E_{app} = - 0.10 V vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: V_{MBs} = 3 μL , $t_{competition}$ = 45 min. Error bars calculated as triple of the standard deviation (n=3).

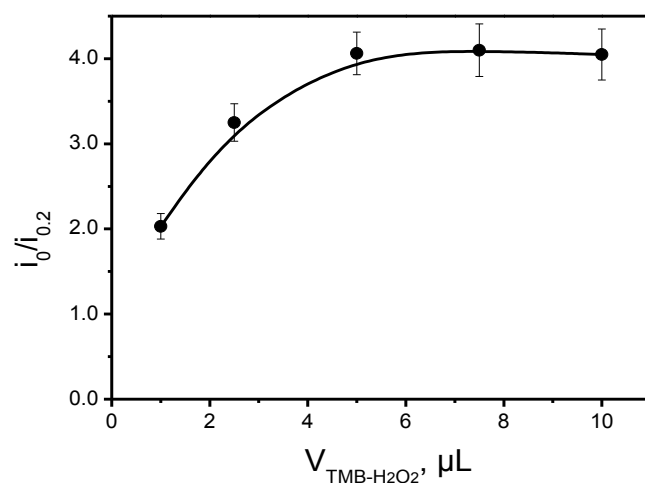
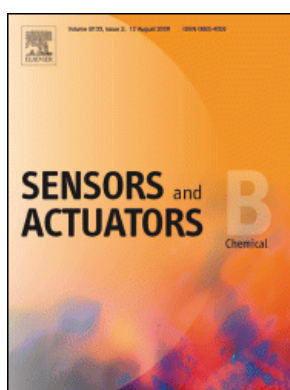


Fig. S5. Effect of the volume of TMB-H₂O₂ on the current ratio values calculated from the amperometric responses obtained with the magnetoimmunosensor for 0.0 and 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ NT-proBNP ($i_0/i_{0.2}$). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; [NT-proBNP]_{immobilized} = 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{NT-proBNP}}$ = 60 min, V_{inc} = 25 μL ; t_{inc} = 30 min; [HRP-antiNT-proBNP]: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$; E_{app} = - 0.10 V vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: V_{MBs} = 3 μL , $t_{\text{competition}}$ = 45 min. Error bars calculated as triple of the standard deviation (n=3).

Ultrasensitive amperometric magnetoimmunosensor for human C-reactive protein quantification in serum

Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez,
V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; J. P. Salvador; M. P. Marco;
Pingarrón, J. M.



Vol. 188 p. 212–220, 2013



Ultrasensitive amperometric magnetoimmunosensor for human C-reactive protein quantification in serum



Berta Esteban-Fernández de Ávila^{a,1}, Vanessa Escamilla-Gómez^{a,1},
Susana Campuzano^{a,1}, María Pedrero^{a,1}, J.-Pablo Salvador^{b,c,2},
M.-Pilar Marco^{b,c,2}, José M. Pingarrón^{a,*}

^a Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

^b Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D), Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^c CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 June 2013

Received in revised form 5 July 2013

Accepted 9 July 2013

Available online 17 July 2013

Keywords:

CRP

Amperometric magnetoimmunosensors

Magnetic beads

Human serum

ABSTRACT

A highly sensitive magnetoimmunosensor for the determination of human C-reactive protein (CRP) is described in this work. A sandwich format involving covalent immobilization of the capture antibody (antiCRP) onto carboxylic-modified magnetic beads (HOOC-MBs) activated with N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC) and N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS), the antigen-antibody reaction and incubation of the modified MBs with a biotinylated antibody (biotin-antiCRP), is used. Furthermore, an incubation step with a Streptavidin HRP (Strp-HRP) conjugate is employed to allow monitoring of the affinity reaction. The resulting modified MBs are captured by a magnet placed under the surface of a disposable gold screen-printed electrode (Au/SPE) and the amperometric responses are measured at -0.10 V (vs. a Ag pseudo-reference electrode), upon addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. The CRP magnetoimmunosensor exhibited a wide range of linearity between 0.07 and 1000 ng mL^{-1} with a low detection limit of $(0.021 \pm 0.005)\text{ ng mL}^{-1}$. The magnetoimmunosensor was successfully applied to the analysis of an international standard for CRP serum.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

C-reactive protein (CRP) is an alpha globulin with a molecular mass of $\sim 110\text{--}140\text{ kDa}$, composed of five identical monomers of 25 kDa each non-covalently assembled as a cyclic pentamer [1]. CRP synthesis in liver by the hepatocytes is stimulated by certain cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α and β , and indirectly by IL-6) [2,3]. This acute-phase protein is normally present as a constituent of serum or plasma at levels lower than 3 mg L^{-1} . CRP is considered a nonspecific biomarker of inflammation and infection that can be used as a predictive risk marker of cardiovascular disease in asymptomatic individuals or as a prognostic marker of recurrent ischemia and death among patients with coronary heart disease or stroke [4–6]. A series of prospective studies provide consistent

data documenting that chronic low-level CRP concentrations can provide prognostic information about the risk of future coronary events in apparently healthy people, and help to predict the risk of ischemic stroke, acute myocardial infarction and peripheral vascular diseases [7]. Indeed, the American Heart Association and the United States Center for Disease Control established three categories of CRP concentration for the evaluation of cardiovascular disease (CVD) and myocardial infarction risk [8–12]: low risk for a CRP concentration below 1.0 mg L^{-1} ; intermediate risk for concentrations between 1.0 and 3.0 mg L^{-1} ; high risk for levels above 3.0 mg L^{-1} . In combination with other tests, CRP assays can contribute to patient care and can be more useful and accurate in diagnosing ongoing problems than almost any other form of patient assessment. Indeed, high sensitive CRP (hs-CRP) assays can determine heart disease risk in people with undetected heart disease and risk of complications for people that have already suffered a heart event.

Nowadays, there are available several tests for C-reactive protein that are employed in clinical practice based on nephelometric and turbidimetric technologies [13,14], and enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) [15]. However, in general, these methods have low sensitivity, are time consuming, cost-ineffective, prone to false negatives, and are not readily applicable for rapid

* Corresponding author. Tel.: +34 913944315; fax: +34 913944329.

E-mail addresses: berta.efa@quim.ucm.es (B. Esteban-Fernández de Ávila), vaneeg@quim.ucm.es (V. Escamilla-Gómez), susanacr@quim.ucm.es (S. Campuzano), mpedrero@quim.ucm.es (M. Pedrero), jpablo.salvador@iqac.csic.es (J.-P. Salvador), pilar.marco@cid.csic.es (M.-P. Marco), pingarro@quim.ucm.es (J.M. Pingarrón).

¹ Tel.: +34 913944315; fax: +34 913944329.

² Tel.: +34 934006100.

point-of-care analysis [16]. Other routine automated methods available for CRP quantification used in the clinical laboratories typically have limits of quantification of 3–8 mg L⁻¹ [14]. A lot of effort has been made in the last years to develop highly sensitive methods suitable for predicting future risk of coronary events in apparently healthy individuals. Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensing platforms for CRP were developed reaching a detection limit of 8 nM (1 µg mL⁻¹) of purified CRP [17] and a linear range within 16–40 nM (2–5 µg mL⁻¹) [18]. Meyer et al. also developed a method based on magnetic detection with a linear detection range between 25 and 2500 ng mL⁻¹ [19]. An indirect-competitive quartz crystal microbalance immunosensor for CRP was reported by Kim et al. with a wide linear concentration range of 0.130–25,016 ng mL⁻¹ and a LOD of 0.130 ng mL⁻¹ [20]. A chemiluminescence methodology has been developed by Lee et al. within an integrated microfluidic system for fast and automatic detection of CRP protein (LOD 0.0125 mg L⁻¹) [12]. Buch and Rishpon developed a disposable sensor with screen-printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes and protein A to detect CRP levels of 0.5 ng mL⁻¹ [7]. Recently, a number of CRP assays using electrochemical impedance spectroscopy (EIS) have also been reported. However, these impedimetric approaches suffer from limited sensitivity [1], not demonstrable specificity [21], or do not encompass a clinically relevant range [22,23].

The use of magnetic beads (MBs) in the development of electrochemical immunosensors has demonstrated to be an useful tool to improve their sensitivity, reduce the time of analysis and minimize matrix effects [24–31]. Electrochemical magnetoimmunosensors allow the analysis of complex samples with no need for pre-enrichment or purification steps due to the “extraction” of the target analyte from the complex matrix and the measurement of the electrochemical signal in a “clean” environment [32]. An antecedent of an electrochemical immunosensor for the determination of CRP using MBs is the paper reported by Gan et al. [33]. They immobilized HRP-labeled detection antibodies on Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles and used the decrease in the electrochemical signal of hydrogen peroxide upon antigen binding on carbon screen-printed electrodes (SPCEs) modified with a chitosan membrane and Fe (III) phthalocyanine for monitoring the affinity reaction.

In this paper, an amperometric magnetoimmunosensor for the determination of CRP using a sandwich configuration, Au/SPEs and HOOC-modified MBs (HOOC-MBs) is reported for the first time. The developed methodology involved the immobilization of the capture antibody on the HOOC-MBs, and successive incubation steps of the modified MBs with the analyte, a specific biotin-labeled detection antibody and a Strep-HRP conjugate. The electrochemical detection of the enzyme reaction product is carried out at a disposable Au/SPE using TMB as electron transfer mediator and H₂O₂ as the enzyme substrate. The applicability of the developed disposable magnetoimmunosensor for clinical diagnosis has been successfully demonstrated by the analysis of a commercial serum with a certified CRP content.

2. Materials and methods

2.1. Apparatus and electrodes

Amperometric measurements were carried out with an ECO Chemie Autolab PGSTAT 101 potentiostat using the software package NOVA 1.7. A P-Selecta (Scharlab) ultrasonic bath and an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A., Scharlab) were also employed. Screen-printed Au electrodes (Au/SPEs, DRP-220AT, purchased from Dropsens) consisting of a 4-mm smooth Au working electrode, an Au counter

electrode and an Ag pseudo-reference electrode, were used. Homogenization of the solutions was facilitated with a Bunsen AGT-9 Vortex. Magnetic separation steps for incubation/washing processes were performed using a Dynal MPC-S (product No. 120.20, Dynal Biotech ASA, Norway) magnetic particle concentrator. A neodymium magnet (AIMAN GZ) was used to control the attraction of the modified-MBs to the Au/SPE surface.

2.2. Reagents and solutions

Carboxylic acid-modified MBs (HOOC-MBs, 2.8 µm, 10 mg mL⁻¹, Dynabeads® M-270 Carboxylic Acid) were purchased from Dynal Biotech ASA. 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), NaCl, KCl, Tween®20, sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, and Tris-HCl were purchased from Scharlab. N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) and ethanolamine were purchased from Sigma-Aldrich.

Anti-human C-reactive protein antibody (antiCRP), and human C-reactive protein (CRP) were kindly provided from Audit Diagnostics. Biotin-conjugated-antiCRP (biotin-antiCRP) was prepared by using EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) according to the protocol described in Section 2.3. Heparin sodium salt from porcine intestinal mucosa (H3149) from Sigma-Aldrich, D-dimer (ab35949) from Abcam, bovine serum albumin (BSA-TYPE VH, 1066.0010) from Gerbu, NT-proBNP and cardiac troponin T (cTnT) from Hytest Ltd., a high sensitivity Strep-avidin HRP (Strep-HRP) conjugate from Roche (Ref: 11 089 153 001, 500 U mL⁻¹) and TMB-H₂O₂ K-Blue reagent solution from Neogen in a ready-to-use reagent format (K-Blue enhanced-activity substrate, also containing H₂O₂) were also used.

It is important to remark that a new CRP solution was prepared daily from a small concentrated aliquot kept frozen at -40 °C due to the short biological half-time life of CRP (less than 24 h) [34].

Moreover, a WHO 1st International Standard for Human C-reactive protein (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, code: 85/506), containing 100 µg mL⁻¹ CRP was used as the sample reference material.

The following solutions prepared in deionized water were also employed: 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0; 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0; phosphate-buffered saline (PBS) consisting of 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5; 0.025 M MES buffer, pH 5.0; 0.01 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.5, PBST) consisting of PBS with 0.05% Tween®20, and 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.2.

Activation of the HOOC-MBs was carried out with an EDC/sulfo-NHS mixture solution (50 mg mL⁻¹ each in MES buffer, pH 5.0). The blocking step was accomplished with a 1 M ethanolamine solution prepared in a 0.1 M phosphate buffer solution of pH 8.0.

All chemicals used were of analytical-reagent grade, and deionized water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm).

2.3. AntiCRP biotinylation

4 mg of antiCRP antibody were dissolved in 2 mL of borate buffer (0.2 M boric acid/sodium borate, pH 8.7) and 0.34 mg of sulfo-NHS-LC-LC-Biotin dissolved in 0.2 mL of MilliQ water were added. The reaction was allowed proceeding under continuous stirring for 4 h at room temperature. The labeled antibody was purified by dialysis and stored freeze-dried at 80 °C. Working 1 mg mL⁻¹ aliquots were prepared in 10 mM PBS (pH 7.5) and stored at 4 °C.

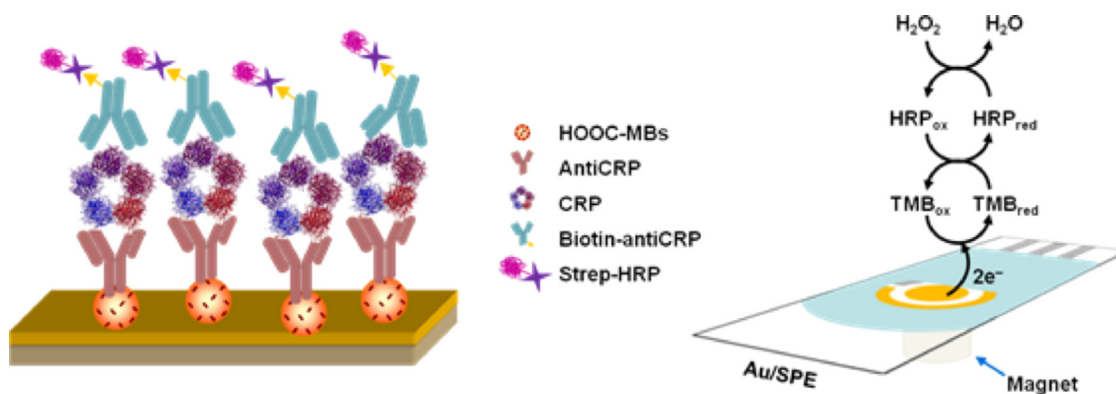


Fig. 1. Schematic display of the developed CRP sandwich magnetoimmunosensor. The enzyme and electrode reactions involved in the amperometric detection of the mediated reduction of H_2O_2 with TMB at the Au/SPE are also shown.

2.4. Modification of MBs

A 3- μL aliquot of the HOOC-MBs commercial suspension was transferred into a 1.5 mL eppendorf tube. Then, the MBs were washed twice with 50 μL MES buffer solution during 10 min under continuous stirring (600 rpm, 25°C). Between each step the particles were concentrated using a magnet and, after 4 min, the supernatant was discarded. The MBs carboxylic groups were activated by incubation during 35 min in 25 μL of the EDC/sulfo-NHS mixture solution. The activated MBs were washed twice with 50 μL of MES buffer and re-suspended in 25 μL of a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ anti-CRP solution (in MES buffer). The antiCRP was captured onto the activated beads during 60 min at 25°C under continuous stirring (600 rpm). Subsequently, the antiCRP-modified MBs were washed twice with 50 μL of MES buffer solution. Thereafter, the unreacted activated groups on the MBs were blocked by adding 25 μL of the 1 M ethanolamine solution (in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0) and incubating the suspension under continuous stirring (600 rpm) for 60 min at 25°C . After two washing steps with 50 μL of 0.1 M Tris-buffer (pH 7.2) and another one with 50 μL of PBST (pH 7.5), the antiCRP-coated MBs were re-suspended in 25 μL of a variable concentration of the free antigen (in PBST, pH 7.5) and incubated during 30 min. Then the modified MBs were washed twice with 50 μL of PBST (pH 7.5) and immersed in a solution containing 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ biotin-antiCRP solution (in PBST, pH 7.5) during 30 min. After two washing steps with the same buffer, the resulting beads were incubated during 30 min in a Strep-HRP (1:1000) solution in PBST, pH 7.5. Finally, the modified-MBs were washed twice with 50 μL of PBST buffer solution (pH 7.5), re-suspended in 45 μL of 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) and immobilized on the Au/SPE surface by placing a neodymium magnet under the working electrode surface.

2.5. Amperometric measurements

Amperometric measurements were carried out at an applied potential of -0.10V vs. the Ag pseudo-reference electrode. After stabilization of the blank current, 5 μL of the TMB- H_2O_2 solution were deposited on the working electrode surface and the current was recorded. The analytical signal was the current measured after 200 s.

Unless otherwise indicated, the reported data corresponded to the average of at least three replicates.

2.6. Analysis of a certified serum sample

The magnetoimmunosensor was employed for the analysis of an International Standard from pooled normal human serum

containing 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CRP. According to the instructions recommended by the supplier of the serum sample, the total content of the ampoule (containing 50 μg of CRP from 0.5 mL pooled normal human serum) was reconstituted at room temperature with 0.5 mL of PBST, pH 7.5, dissolved totally by gentle swirling to avoid froth, subdivided in small fractions and frozen rapidly to below -40°C in the dark. CRP determination was performed after a 1000-times dilution with PBST. The antiCRP-modified MBs, prepared as described in Section 2.4, were re-suspended in a 25 μL aliquot of the prepared serum samples during 30 min and a similar procedure to that described in Sections 2.4 and 2.5 was followed.

3. Results and discussion

The fundamentals of the immunosensor configuration as well as of the electrochemical transduction are displayed in Fig. 1. Briefly, the antiCRP was covalently immobilized onto the HOOC-MBs previously activated with an EDC/sulfo-NHS solution. After a blocking step with ethanolamine of the unreacted activated groups of the commercial MBs, the antiCRP-MBs were incubated in the sample solution and the target protein was sandwiched with the biotinylated-detector antibody labeled in a final step with a Strep-HRP conjugate.

The MBs bearing the sandwich immunocomplexes were magnetically captured on the Au/SPE by means of a neodymium magnet placed under the working electrode surface, and the biorecognition event was monitored by amperometric measurement of the reduction current generated after the addition of the TMB- H_2O_2 substrate [35]. Using this methodology, the Au/SPE acted only as the electrochemical transducer while all the immunoreactions occurred on the surface of the MBs.

3.1. Optimization of the working variables

The influence of the capture and detection antibodies concentrations in the incubation solutions was tested by checking the amperometric response measured at -0.10V (vs. Ag pseudo-reference electrode) with the corresponding magnetoimmunosensors for 1 ng mL^{-1} CRP. The applied detection potential was optimized previously using the mediated reduction of H_2O_2 with TMB at an Au/SPE [31].

The effect of the amount of capture antibody immobilized on the activated MBs is shown in Fig. 2a. The measured current increased with the antibody loading up to 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and decreased for larger antiCRP concentrations, which is most likely due to the sterically hindered binding of the antigen when high concentrations of capture antibody were employed. Therefore, a value of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antiCRP was selected for further work. Moreover, the influence of

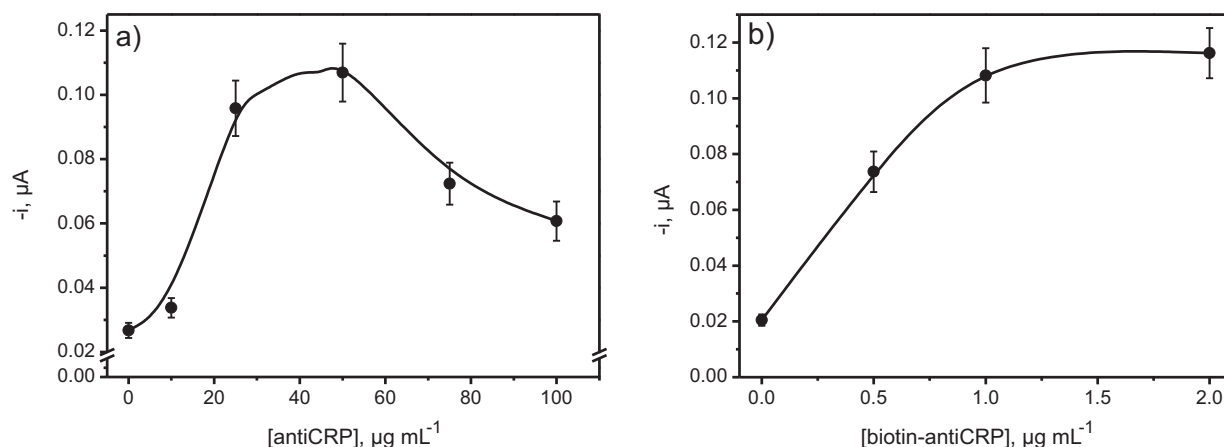


Fig. 2. Effect of the antiCRP concentration immobilized on the activated HOOC-MBs (a) and of the biotin-antiCRP concentration (b) on the amperometric responses measured with the sandwich magnetoimmunosensor for 1 ng mL^{-1} CRP. Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, $\text{pH } 7.0$; $V_{\text{MBs}} = 3 \text{ } \mu\text{L}$; Strep-HRP dilution factor = $1:1000$; $V_{\text{inc}} = 25 \text{ } \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs. Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: $[\text{biotin-antiCRP}] = 1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in (a) and $[\text{antiCRP}] = 50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ in (b). Error bars calculated as triple of the standard deviation ($n = 3$).

the biotin-antiCRP concentration was tested in the $0\text{--}2 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ range. As can be seen in Fig. 2b, the current increased with the biotinylated antibody concentration up to $1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ leveling off above this value. Consequently, this biotin-antiCRP loading was selected for further studies.

Another relevant variable to be optimized is the Strep-HRP concentration used to label the secondary antibody. Several dilution factors were applied to the original reagent and, as it is shown in Fig. 3, the maximum signal was obtained using a $1:1000$ dilution which agreed with the value recommended by the reagent supplier.

The time implied in the different incubation steps was optimized in a similar manner. All the tested ranges for the different variables as well as the selected values for the magnetoimmunosensor functioning are summarized in Table 1.

Furthermore, we evaluated the effect of reducing the assay time. This was carried out by doing the antigen capture and labeling in only one step (45 min incubation of the antiCRP-MBs in a mixture containing CRP, biotin-antiCRP and Strep-HRP) or in two steps (30 min incubation of the antiCRP-MBs in the CRP solution, followed by another 30 min incubation in a mixture

containing biotin-antiCRP and Strep-HRP), instead of the three steps described in Section 2.3. Fig. 4 compares the amperometric responses obtained using the different incubation protocols for a CRP concentration of 1000 ng mL^{-1} . This concentration value was chosen in order to work under conditions where possible aggregation of protein may occur. As it can be seen, although the immunosensor response was sufficient to discriminate between 0

Table 1

Optimization of the different experimental variables involved in the preparation of the electrochemical magnetoimmunosensor for CRP.

Experimental variable	Tested ranges	Selected values
$[\text{antiCRP}], \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	$0\text{--}100$	50
$[\text{biotin-antiCRP}], \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$	$0\text{--}2$	1
[Strep-HRP]	$1:500\text{--}1:2000$	$1:1000$
$V_{\text{MBs}}, \text{ } \mu\text{L}^a$	$2\text{--}6$	3
$t_{\text{antiCRP}}, \text{ min}$	$15\text{--}120$	60
$t_{\text{CRP}}, \text{ min}$	$15\text{--}60$	30
$t_{\text{biotin-antiCRP}}, \text{ min}$	$15\text{--}60$	30
$t_{\text{Strep-HRP}}, \text{ min}$	$15\text{--}60$	30
$V_{\text{TMB-H}_2\text{O}_2}, \text{ } \mu\text{L}^a$	$1\text{--}10$	5

^a Experimental variables optimized in previous work [36].

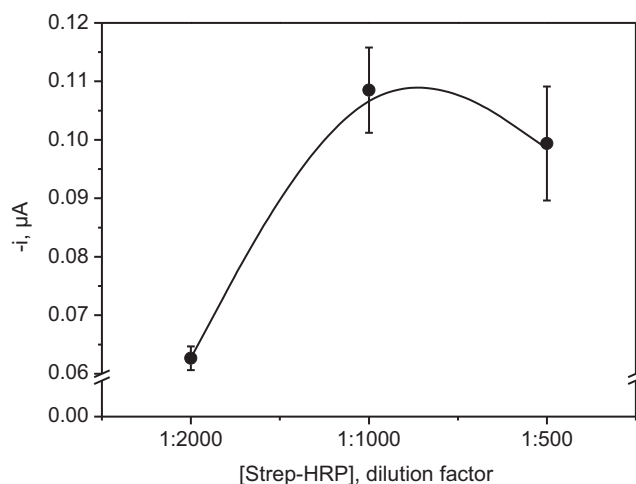


Fig. 3. Effect of the Strep-HRP dilution factor on the amperometric response measured for 1 ng mL^{-1} CRP with the sandwich magnetoimmunosensor. Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, $\text{pH } 7.0$; $V_{\text{MBs}} = 3 \text{ } \mu\text{L}$; $V_{\text{inc}} = 25 \text{ } \mu\text{L}$; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs. Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: $[\text{biotin-antiCRP}] = 1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$; $[\text{antiCRP}] = 50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Error bars calculated as triple of the standard deviation ($n = 3$).

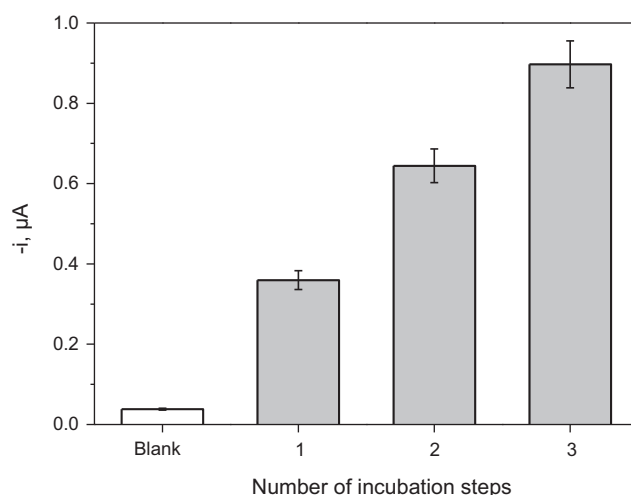


Fig. 4. Amperometric responses measured at -0.10 V vs. the Ag pseudo-reference electrode for solutions containing 1000 ng mL^{-1} CRP (gray bars) as a function of the number of incubation steps used to modify the MBs in the sandwich immunoassay configuration. Error bars calculated as triple of the standard deviation ($n = 3$).

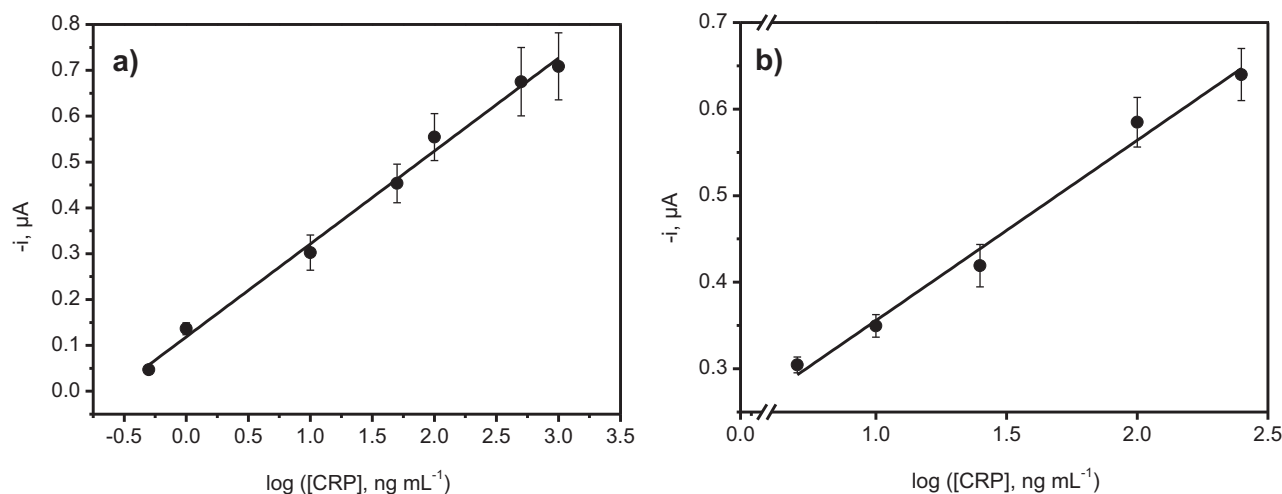


Fig. 5. Calibration curves constructed for CRP standards prepared in PBST (a) or in the sample reference material diluted 20,000 times (b). Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n = 3$).

and 1000 ng mL⁻¹ CRP (cut-off value for this biomarker) using only one or two incubation steps, a remarkable better signal-to-blank ratio was achieved when the three incubation steps described in Section 2.3 were accomplished. It is worth to mention that the current measured in the absence of CRP (white bar in Fig. 4) is independent of the number of incubation steps used. Taking into account these results, the protocol involving three incubation steps was selected to evaluate the analytical characteristics of the magnetoimmunosensor.

3.2. Analytical characteristics

Under the optimized experimental conditions, a calibration plot for CRP was constructed in PBST (Fig. 5a). A linear relation between the measured current and the logarithm of CRP concentration was found over the 0.07–1000 ng mL⁻¹ range, with a slope value of $(2.03 \pm 0.07) \times 10^{-7}$ A and an intercept of $(1.2 \pm 0.1) \times 10^{-7}$ A ($r = 0.997$). The linear calibration plot, covering more than four orders of magnitude of CRP concentration, leveled off for higher concentration values.

The limits of detection (LOD) and determination (LOQ) were calculated according with the $3s/m$ and $10s$ criteria, respectively, where m is the slope of the linear calibration plot, and s was estimated as the standard deviation of the amperometric signals obtained in the absence of CRP, expressed in concentration units when determining LOQ. LOD and LOQ values were 0.021 and 0.07 ng mL⁻¹, respectively. It should be emphasized that the achieved LOD is 48,000 times lower than the 1000 ng mL⁻¹ minimal clinical threshold recommended in serum/plasma samples to predict a moderate risk of myocardial infarction and stroke. This low LOD means a great practical advantage in the case of existing strong matrix effects for real clinical samples, which makes a sample dilution necessary before the analysis. The K_d value of the antibody-antigen interaction was estimated by ELISA (see Supporting Information). The low K_d value obtained, 4.75 nM, indicated the high affinity of such interaction [37], therefore supporting the high sensitivity found with the magnetoimmunosensor.

The reproducibility of the amperometric responses obtained with different magnetoimmunosensors constructed following the same protocol was evaluated by performing measurements for 500 ng mL⁻¹ CRP. Results from 9 different immunosensors prepared on the same day yielded an RSD value of 6.5% thus demonstrating that the magnetoimmunosensor fabrication

procedure (MBs modification and magnetic capture on the Au/SPE surface) and the amperometric transduction method were reliable.

The developed methodology implies that the immunoreactions are carried out only on the MBs and not on the electrode surface. Therefore, the storage stability of the antiCRP-MBs conjugates, once the blocking step with ethanolamine was performed, was checked. AntiCRP-MBs were stored at 4 °C in eppendorfs containing 50 μL of filtered PBST. Each working day two replicates of the prepared conjugates were incubated in a 500 ng mL⁻¹ CRP solution according to the procedure described in Section 2.4. A control chart was constructed by setting the mean value of the current measured with 9 different immunosensors on the first day of the study as the central value, and $\pm 3 \times$ the standard deviation of this value as the upper and lower control limits (data not shown). The antiCRP-MBs conjugates provided amperometric measurements within the control limits during 6 days indicating an acceptable stability of the capture antibody-modified MBs. This result supports the possibility of carrying the stored conjugates to the place where samples are taken, and performing the determination of the target protein *in situ*.

3.3. Selectivity of the developed magnetoimmunosensor

The selectivity of the magnetoimmunosensor was evaluated toward various non-target compounds at their concentrations commonly found in serum or plasma (5 mg mL⁻¹ BSA, 500 ng mL⁻¹ D-dimer and 4000 μg mL⁻¹ heparin) and two other non-target cardiac proteins at much higher concentrations than their normal values in serum: 7.5 ng mL⁻¹ of amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and 500 ng mL⁻¹ of cardiac troponin T (cTnT). The tests were performed by comparing the current values measured with the magnetoimmunosensor for 500 ng mL⁻¹ CRP in the absence and in the presence of the potential interfering compounds. Fig. 6 clearly shows that the presence of BSA, D-dimer and heparin at their usual concentrations found in serum and plasma did not interfere significantly in the CRP determination. Moreover, the target cardiac protein can be accurately determined in the presence of other two cardiac proteins (cTnT and NT-proBNP) at a concentration much higher than that normally found in these biological samples. The great selectivity achieved can be attributed to the use of two specific antibodies in the design of the sandwich magnetoimmunosensor, which drastically reduces the possibility

Table 2

Analytical characteristics for different CRP immunosensors and immunoassays reported in the literature.

Methodology	Technique	Sample	Concentration range	LOD	Assay time ^a	Reference
Electro-chemiluminescence immunoassay using [Ru(bpy) ₃] ²⁺ -containing microspheres as labels	ECL	Human plasma	0.010–10 µg mL ⁻¹	0.01 µg mL ⁻¹	4 h	[39]
SPR sandwich based immunosensor	SPR	–	2–5 µg mL ⁻¹	1 µg mL ⁻¹	–	[18]
Electro-chemiluminescence immunoassay using Ru(bpy) ₃ ²⁺ -encapsulated liposomes as labels	ECL	–	100–10,000 ng mL ⁻¹	100 ng mL ⁻¹	3 h 30 min	[40]
Electrical immunosensor based on the use of silicon nanowire arrays	Electrical responses	–	1 fM–1 nM	–	3 h 35 min	[41]
Electrochemical immunosensor based on a heterogeneous sandwich immunoassay and SPEs modified with MWCNTs and protein A	Amperometry (<i>E</i> _{app} = 0.00 V vs. Ag/AgCl)	Serum	0.5–200 ng mL ⁻¹	0.5 ng mL ⁻¹	7 h	[7]
Label-free impedance immunosensor based on the covalent antibodies immobilization on a three-dimensional ordered macroporous (3DOM) gold film MPA-modified electrode	EIS	Serum	0.1–20 ng mL ⁻¹	0.1 ng mL ⁻¹	39 h	[22]
Label-free electrochemical impedance immunosensor based on covalent antibody immobilization using EDC/NHS on MUA/MPA-SAMs-modified gold electrodes	EIS	–	45 ng mL ⁻¹ –5.84 µg mL ⁻¹	30 ng mL ⁻¹	18 h 40 min	[42]
Electrochemical sandwich immunosensor based on a PDMS–Au nanoparticles composite microfluidic chip and ZnSe quantum dots bioconjugated with the secondary antibody as labels	SWASV	Serum	0.5–200 (g L ⁻¹)	0.22 (g L ⁻¹)	66 h 10 min	[43]
Label-free capacitive immunosensor based on the covalent antibody immobilization on Au interdigitated electrodes fabricated on SiO ₂ surface	Capacitance/dielectric measurements	Serum	25 pg mL ⁻¹ –25 ng mL ⁻¹	32 pg mL ⁻¹	31 h	[44]
Impedimetric immunosensor based on the antibodies immobilization on the surface of nanocrystalline diamond	EIS	Serum	Clear discrimination between 1 µM, 100 nM, and 10 nM	10 nM	14 h	[1]
Signal-amplified piezoelectric sensor for the detection of hs-CRP using HRP doped magnetic core-shell Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @Au nanostructures as labels	Piezoelectric	Serum	0.01–200 ng mL ⁻¹	5 pg mL ⁻¹	20 h 10 min	[38]
Label-free electrochemical impedance immunosensor based on antibody immobilization on standard polycrystalline Au electrodes	EIS	Blood serum	60 µg L ⁻¹ –6.0 mg L ⁻¹	19 µg L ⁻¹	18 h 15 min	[45]
Chip-based point-of-care testing application based on a nanogap-embedded field effect transistor (FET)	FET	Serum	0.1–100 ng mL ⁻¹	0.1 ng mL ⁻¹	65 min	[46]
Renewable amperometric immunosensor for hs-CRP based on functionalized Fe ₃ O ₄ @Au magnetic nanoparticles attracted on a Fe (III) phthalocyanine/chitosan-membrane modified screen-printed carbon electrode by a magnet	Amperometry (<i>E</i> _{app} = −0.3 V)	Serum	1.2–200 ng mL ⁻¹	0.5 ng mL ⁻¹	22 h 30 min	[33]
Sandwich magnetosensor involving the use of HOOC-MBs and Au/SPEs	Amperometry (<i>E</i> _{app} = −0.10 V vs. Ag pseudo-reference electrode)	Human serum	0.5–1000 ng mL ⁻¹	21 pg mL ⁻¹	4 h 25 min	This work

Au/SPEs: gold screen-printed carbon electrodes; ECL: electrochemiluminescence; EDC: N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl) carbodiimide; EIS: electrochemical impedance spectroscopy; MPA: 3-mercaptopropionic acid; MUA: 11-mercaptopundecanoic acid; MWCNTs: multiwalled carbon nanotubes; NHS: N-hydroxy succinimide; PDMS: poly(dimethylsiloxane); SPR: surface plasmon resonance; SWASV: square-wave anodic stripping voltammetry.

^a Includes immunosensors preparation and final measurement.

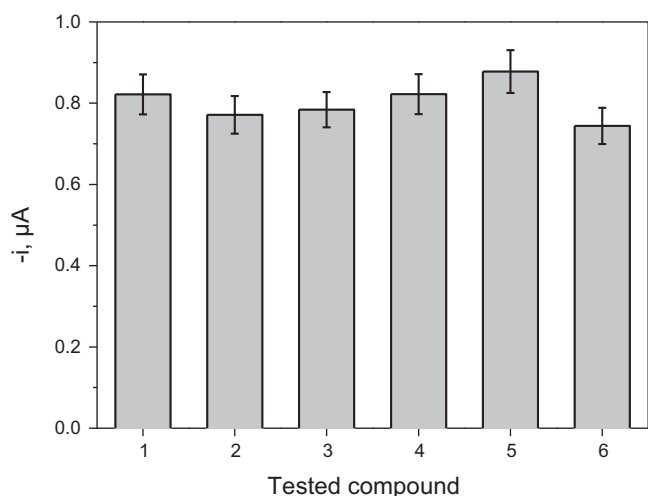


Fig. 6. Selectivity control for the CRP magnetosensor. Current values measured for 500 ng mL⁻¹ CRP in the absence (1) and in the presence of 5 mg mL⁻¹ BSA (2), 7.5 ng mL⁻¹ NTproBNP (3), 500 ng mL⁻¹ cTnT (4), 500 ng mL⁻¹ D-dimer (5) and 4000 μg mL⁻¹ heparin (6). Error bars were calculated as triple of the standard deviation ($n=3$).

of false negative results thus offering a secure diagnostic to the user.

3.4. Application to the analysis of a certified human serum

The validity of the developed methodology for clinical analysis was checked by analyzing an International Standard for CRP serum containing a certified concentration of 100 μg mL⁻¹ CRP in the reconstituted sample. The possible existence of a matrix effect was tested by constructing a calibration plot from the sample diluted with PBST until a final CRP concentration of 5 ng mL⁻¹ adequately spiked with growing amounts of a standard CRP solution up to 1000 ng mL⁻¹ CRP (Fig. 5b). The slope value of the linear calibration plot ($r=0.994$) was $(2.1 \pm 0.1) \times 10^{-7}$ A with an intercept value of $(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-7}$ A. This slope is statistically similar to that obtained with the buffered standard CRP solutions $(2.03 \pm 0.07) \times 10^{-7}$ A and, therefore, it could be concluded that no significant matrix effect was apparent after the sample dilution. Accordingly, the CRP quantification could be accomplished by simple interpolation of the measured current for the sample into the calibration plot constructed with buffered CRP standards. The analysis of ten diluted serum samples containing nominally 100 ng mL⁻¹ CRP yielded a mean content of (101 ± 2) ng mL⁻¹. A statistical comparison according to the Student's t test gave a $t_{\text{calc}} = 0.941$ lower than $t_{\text{tab}} = 2.262$. Therefore, it could be concluded that there were no significant differences between the results provided by the magnetosensor and the certified value at a confidence level of 95%. It should be remarked that the magnetosensor can be applied to the clinical determination of this cardiac marker with a minimal sample treatment (just a dilution in the buffer solution) and in a total assay time of approximately 90 min (once the antiCRP-MBs are prepared).

3.5. Comparison with other immunosensors and ELISA assays reported in the literature

The performance of the amperometric sandwich magnetosensor was compared with data available in the literature for other recent CRP immunosensors and immunoassays (Table 2). As it can be deduced, the developed magnetosensor offers the broadest linear range and one of the best LODs. Only the piezoelectric sensor reported by Gan et al. [38] achieved a lower value

(5 pg mL⁻¹). In particular, the comparison with the immunosensor developed by Gan et al. [33] should be emphasized. The magnetosensor developed in this work shows a much wider linear range as compared to that achieved by Gan et al. which ranged from 1.2 to 200 ng mL⁻¹. Moreover, the achieved LOD is more than one order of magnitude lower than that reported in Gan's work (0.5 ng mL⁻¹).

Furthermore, some important advantages of the magnetosensor rely on the simplicity and much easier potential automation and miniaturization of this approach compared with the complex and time consuming substrate modification or bioconjugates labels preparation protocols. These constitute relevant factors to be considered for designing point-of-care (POC) diagnosis and prognosis tests.

Moreover, a performance comparison with commercial sandwich ELISA spectrophotometric kits for CRP is also made in Table 1 in the Supporting Information. As it can be seen, their LODs range from 0.002 (Abcam) to 100 ng mL⁻¹ (Abnova). Apart from the lower sensitivity of most of the ELISA kits compared to that of the magnetosensor, these methods require a pretreatment of the biological sample (normally a centrifugation step), and involve complicated, tedious and time-consuming multi-stage processes. Some other tests based on immunonephelometric, immunoturbidimetric and immunoluminometric measurements are also available from different Companies, with LODs between 0.005 and 0.32 mg L⁻¹ and with a linear response within 0.3 and 10 mg L⁻¹ [14].

It is also important to remark that the magnetosensor allows the determination of CRP in other biological samples besides plasma and serum, where the biomarker concentration is significantly lower such as feces and urine (with CRP contents <56 and 6 ng mL⁻¹, respectively). The developed biosensors also offers a promising alternative for some other recently demanding applications, such as the diagnosis and prognosis of cancer where the concentrations of tumor related proteins are very low at early stages of the disease. Recent studies have demonstrated the potential clinical use of slightly increased CRP levels to predict risk of certain types of cancer and to improve staging and treatment allocation in patients diagnosed with cancer [47].

4. Conclusions

In this work, a disposable amperometric magnetosensor for sensitive measuring of CRP in human serum which can be used in predicting future cardiovascular events is reported. The magnetosensor possesses an excellent analytical performance achieving a LOD of 0.021 ng mL⁻¹, value well below the minimum cut-off value (1000 ng mL⁻¹) to qualify the severity of risk for cardiovascular disease, and allowing the reliable detection of CRP across the clinical relevant range in dilute blood serum. The applicability of the developed magnetosensor was demonstrated by the analysis of a standard serum containing a certified CRP content. Moreover, taking into account the cut-off value for CRP and the high sensitivity of this approach, the presented methodology can be simplified and shortened by performing only a single incubation step including all the immunoreagents. The great analytical performance exhibited in combination with the use of disposable mass-produced biosensors constitutes important advantages for an easy integration of the presented methodology into portable and multiplexed formats. We believe the presented results serve as an important basis for the implementation of convenient POC devices for clinical diagnosis and prognosis through the detection of a biomarker considered as a sensitive reporter of infection, trauma, inflammation and cardiac and cancer risk.

Acknowledgments

The financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2012-34238, and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. A part of the work has been performed in the project 120215-CAJAL4 EU, in which the Spanish partners are funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, and the ENIAC Joint Undertaking. B. Esteban-Fernández de Ávila acknowledges a FPI fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. The authors would like to acknowledge Audit Diagnostics Company for kindly providing the CRP protein and its specific capture and detector antibodies.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.026>.

References

- [1] V. Vermeeren, L. Grieten, N. Vanden Bon, N. Bijmens, S. Wenmackers, S.D. Janssens, K. Haenen, P. Wagner, L. Michiels, Impedimetric, diamond-based immunosensor for the detection of C-reactive protein, *Sensors and Actuators B: Chemical* 157 (2011) 130–138.
- [2] H. Gewurz, X.-H. Zhang, T.F. Lint, Structure and function of the pentraxins, *Current Opinion in Immunology* 7 (1995) 54–64.
- [3] G. Poznanovic, M. Petrovic, Z. Magic, Reestablishment of homeostasis and the acute-phase proteins, *Panminerva Medica* 39 (1997) 291–298.
- [4] A. May, T.J. Wang, Evaluating the role of biomarkers for cardiovascular risk prediction: focus on CRP, BNP and urinary microalbumin, *Expert Review of Molecular Diagnostics* 7 (2007) 793–804.
- [5] V.M. Miller, M.M. Redfield, J.P. McConnell, Use of BNP and CRP as biomarkers in assessing cardiovascular disease: diagnosis versus risk, *Current Vascular Pharmacology* 5 (2007) 15–25.
- [6] N.D. Mygind, M.J. Harutyunyan, A.B. Mathiasen, R.S. Ripa, J.J. Thune, J.P. Gotze, J.S. Johansen, J. Kastrup, C.T. Grp, The influence of statin treatment on the inflammatory biomarkers YKL-40 and HsCRP in patients with stable coronary artery disease, *Inflammation Research* 60 (2011) 281–287.
- [7] M. Buch, J. Rishpon, An Electrochemical immunosensor for C-reactive protein based on multi-walled carbon nanotube-modified electrodes, *Electroanalysis* 20 (2008) 2592–2594.
- [8] I. Kushner, A.R. Sehgal, Is high-sensitivity C-reactive protein an effective screening test for cardiovascular risk? *Archives of Internal Medicine* 162 (2002) 867–869.
- [9] L.R. Benzaquen, H. Yu, N. Rifai, Elevated CRP levels predict poor prognosis of future cardiac events both in patients with coronary disease, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 39 (2002) 459–497.
- [10] T.A. Pearson, G.A. Mensah, R.W. Alexander, J.L. Anderson, R.O. Cannon 3rd, M. Criqui, Y.Y. Fadl, S.P. Fortmann, Y. Hong, G.L. Myers, N. Rifai Jr., S. Smith, K.A. Taubert, R.P. Tracy, F. Vinicor, Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: a statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association, *Circulation* 107 (2003) 499–511.
- [11] P.M. Ridker, Inflammation in atherothrombosis: how to use high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP) in clinical practice, *American Heart Hospital Journal* 2 (4 (Suppl. 1)) (2004) 4–9.
- [12] W.B. Lee, Y.H. Chen, H.I. Lin, S.C. Shiesh, G.B. Lee, An integrated microfluidic system for fast, automatic detection of C-reactive protein, *Sensors and Actuators B: Chemical* 157 (2011) 710–721.
- [13] W.L. Roberts, R. Sedrick, L. Moulton, A. Spencer, N. Rifai, Evaluation of four automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications, *Clinical Chemistry* 46 (2000) 461–468.
- [14] W.L. Roberts, L. Moulton, T.C. Law, G. Farrow, M. Cooper-Anderson, J. Savory, N. Rifai, Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2, *Clinical Chemistry* 47 (2001) 418–425.
- [15] E.M. Macy, T.E. Hayes, R.P. Tracy, Variability in the measurement of C-reactive protein in healthy subjects: implications for reference intervals and epidemiological applications, *Clinical Chemistry* 43 (1997) 52–58.
- [16] T.A. Pearson, G.A. Mensah, Y.L. Hong, S.C. Smith, CDC/AHA workshop on markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: overview, *Circulation* 110 (2004) E543–E544.
- [17] W.P. Hu, H.Y. Hsu, A. Chiou, K.Y. Tsens, H.I. Lin, G.L. Chang, S.J. Chen, Immuno-detection of pentamer and modified C-reactive protein using surface plasmon resonance biosensing, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1631–1637.
- [18] M.H. Meyer, M. Hartmann, M. Keusgen, SPR-based immunosensor for the CRP detection—a new method to detect a well know protein, *Biosensors and Bioelectronics* 21 (2006) 1987–1990.
- [19] M.H. Meyer, M. Hartmann, H.J. Krause, G. Blankenstein, B. Mueller-Chorus, J. Oster, P. Miethe, M.M. Keusgen, CRP determination based on a novel magnetic biosensor, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 973–979.
- [20] N. Kim, D.K. Kim, Y.J. Cho, Development of indirect-competitive quartz crystal microbalance immunosensor for C-reactive protein, *Sensors and Actuators B: Chemical* 143 (2009) 444–448.
- [21] H. Hennessey, N. Afara, S. Omanovic, A.L. Padjen, Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface, *Analytica Chimica Acta* 643 (2009) 45–53.
- [22] X. Chen, Y. Wang, J. Zhou, W. Yan, X. Li, J.-J. Zhu, Electrochemical impedance immunosensor based on three-dimensionally ordered macroporous gold film, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 2133–2140.
- [23] A. Qureshi, Y. Gurbuz, S. Kallempudi, J.H. Niazi, Label-free RNA aptamer-based capacitive biosensor for the detection of C-reactive protein, *Physical Chemistry Chemical Physics* 12 (2010) 9176–9182.
- [24] J.M. Nam, C.S. Thaxton, C.A. Mirkin, Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins, *Science* 301 (2003) 1884–1886.
- [25] A. Bange, H.B. Halsall, W.R. Heineman, Microfluidic immunosensor systems, *Biosensors and Bioelectronics* 20 (2005) 2488–2503.
- [26] N.L. Rosi, C.A. Mirkin, Nanostructures in bionanotechnology, *Chemical Reviews* 105 (2005) 1547–1562.
- [27] C.A. Marquette, L.J. Blum, State of the art and recent advances in immunoanalytical systems, *Biosensors and Bioelectronics* 2 (2006) 1424–1433.
- [28] H. Zhang, X. Cheng, M. Richter, M.I. Greene, A sensitive and high-throughput assay to detect low-abundance proteins in serum, *Nature Medicine* 12 (2006) 473–477.
- [29] I. Willner, R. Baron, B. Willner, Integrated nanoparticle-biomolecule systems for biosensing and bioelectronics, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 1841–1852.
- [30] F. Conzuelo, M. Gamella, S. Campuzano, A.J. Reviejo, J.M. Pingarrón, Disposable amperometric magneto-immunosensor for direct detection of tetracyclines antibiotics residues in milk, *Analytica Chimica Acta* 737 (2012) 29–36.
- [31] B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, Disposable electrochemical magnetoimmunosensor for the determination of Troponin T Cardiac Marker, *Electroanalysis* 24 (2012) 51–58.
- [32] E. Zacco, M.I. Pividori, S. Alegret, R. Galve, M.P. Marco, Electrochemical biosensing of pesticide residues based on affinity biocomposite platforms, *Analytical Chemistry* 78 (2006) 1780–1788.
- [33] N. Gan, L. Meng, F. Hu, Y. Cao, Y. Wu, L. Jia, L. Zheng, A renewable amperometric immunosensor for hs-CRP based on functionalized Fe₃O₄@Au magnetic nanoparticles attracted on Fe(III) phthalocyanine/chitosan-membrane modified screen-printed carbon electrode by a magnet, *Applied Mechanics and Materials* 110–116 (2012) 519–526.
- [34] C. Foglar, R.W. Lindsey, C-reactive protein in orthopedics, *Orthopedics* 21 (6) (1998) 687–691.
- [35] P.D. Josephy, T. Eling, R.P. Mason, The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates, *Journal of Biological Chemistry* 257 (1982) 3669–3675.
- [36] B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J.M. Pingarrón, Disposable amperometric magnetoimmunosensor for the sensitive detection of the cardiac biomarker amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide in human serum, *Analytica Chimica Acta* 784 (2013) 18–24.
- [37] Y. Huang, M.C. Bell, I.I. Suni, Impedance biosensor for peanut protein ara h 1, *Analytical Chemistry* 80 (2008) 9157–9161.
- [38] N. Gan, L. Wang, H. Zhou, T. Li, W. Sang, F. Hu, Y. Cao, A signal-amplified piezoelectric sensor for the detection of hs-CRP using HRP doped magnetic core-shell Fe₃O₄@SiO₂@Au nanostructures as labels, *International Journal of Electrochemical Science* 7 (2012) 11564–11577.
- [39] W.J. Miao, A.J. Bard, Electrogenerated chemiluminescence. 80. C-reactive protein determination at high amplification with [Ru(bpy)₃]²⁺-containing microspheres, *Analytical Chemistry* 76 (2004) 7109–7113.
- [40] W. Zhan, A.J. Bard, Electrogenerated chemiluminescence. 83. Immunoassay of human C-reactive protein by using [Ru(bpy)₃]²⁺-encapsulated liposomes labels, *Analytical Chemistry* 79 (2007) 459–463.
- [41] M.H. Lee, K.N. Lee, S.W. Jung, W.H. Kim, K.S. Shin, W.K. Seong, Quantitative measurement of C-reactive protein using silicon nanowire arrays, *International Journal of Nanomedicine* 3 (2008) 117–124.
- [42] N. Puri, V.K. Tanwar, V. Sharma, T. Ahuja, A.M. Biradar, Rajesh Electrochemical characterization of surface modified gold electrode for the detection of C-reactive protein, *International Journal of Integrative Biology* 9 (2009) 1–5.
- [43] F. Zhou, M. Lu, W. Wang, Z.-P. Bian, J.-R. Zhang, J.-J. Zhu, Electrochemical immunosensor for simultaneous detection of dual cardiac markers based on a poly(dimethylsiloxane)-gold nanoparticles composite microfluidic chip: a proof of principle, *Clinical Chemistry* 56 (2010) 1701–1707.
- [44] A. Qureshi, J.H. Niazi, S. Kallempudi, Y. Gurbuz, Label-free capacitive biosensor for sensitive detection of multiple biomarkers using gold interdigitated capacitor arrays, *Biosensors and Bioelectronics* 25 (2010) 2318–2323.
- [45] T. Bryan, L. Luo, P.R. Bueno, J.J. Davis, An optimised electrochemical biosensor for the label free detection of C-reactive protein in blood, *Biosensors and Bioelectronics* 39 (2013) 94–98.
- [46] C.-H. Kim, J.-H. Ahn, J.-Y. Kim, J.-M. Choi, K.-C. Lim, T.J. Park, N.S. Heo, H.G. Lee, J.-W. Kim, Y.-K. Choi, CRP detection from serum for chip-based point-of-care testing system, *Biosensors and Bioelectronics* 41 (2013) 322–327.
- [47] K.H. Allin, B.G. Nordestgaard, Elevated C-reactive protein in the diagnosis, prognosis and cause of cancer, *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 48 (4) (2011) 155–170.

Biographies



Berta Esteban-Fernández de Ávila received her degree in "Science and Food Technology" from the Universidad Autónoma de Madrid (Spain) in June 2009. She is working on her PhD in Analytical Chemistry in the Universidad Complutense de Madrid (Spain) since September 2009. She belongs to the "Electroanalysis and Electrochemical (Bio)sensors" research group. She worked as a Research Scholar in the research group of Prof. G. Palleschi at the Department of Scienze e Tecnologie Chimiche in Università di Roma Tor Vergata (Italy) from February to June 2012. Her areas of interest include the development of immuno and DNA electrochemical sensors for clinical diagnosis.



J.-Pablo Salvador received his PhD in Chemistry from University of Barcelona in 2007. Since 2007 he works as Research Assistant by CIBER-BBN in the Nanobiotechnology for Diagnostics group (Nb4D) at IQAC-CSIC. His areas of interest are around the production of antibodies for the detection of small molecules, peptides or proteins and their application as analytical tools such as ELISA. The use of these antibodies in biosensing has also studied for the development of fluorescent microarrays or biosensors based on plasmonic properties.



M.-Pilar Marco finished her PhD thesis entitled *Synthesis and Regulatory Aspects of the Insect Molting Hormone System* in 1990. She worked as a postdoctoral researcher (1990–1993) at the University of California in Davis in Prof. Bruce D. Hammock's group on *Immunochemical Analytical Methods for Environmental and Biological Monitoring*. Nowadays, she is the Coordinator of the *Nanomedicine Area* of the Networking Research Center for Bioengineering, Biomaterials and Nanomedicine (CIBER-BBN). She works on *new transducing principles to develop bioanalytical multiplexed platforms* for clinical diagnostics. She has been principal investigator of a number of research projects and is co-author on more than 160.



José M. Pingarrón obtained his PhD in Sciences from Complutense University of Madrid. He is Professor of Analytical Chemistry at Complutense University of Madrid and head of the group "Electroanalysis and electrochemical (bio)sensors". Current research includes the development of nanostructured electrochemical biosensors, including enzyme electrodes, immunosensors and genosensors for the ultrasensitive detection of bacteria, low molecule weight hormones and cancer markers as well as electrochemical arrays for multiplexed detection. He is Associate Editor of the journal *Electroanalysis* and Vice-president of the Spanish Royal Society of Chemistry. He has authored over 275 research papers and several books and book

chapters.



Vanessa Escamilla-Gómez received her PhD in Analytical Chemistry from the Universidad Complutense de Madrid (Spain) in 2009. Since 2003, she has been working in the Analytical Chemistry Department of the Chemistry Faculty of this University, where she is currently working at the European Project "Chip Architectures by Joint Associated Labs for European diagnostics (Cajal 4 EU)". Her areas of interest include the development of enzymatic, immuno-electrochemical sensors, bioelectrocatalysis, and electrode modification for the ultrasensitive detection of bacteria and cardiac markers. She is also involved in the development of electrochemical arrays for multiplexed detection. She is co-author of ten research

papers.



Susana Campuzano received her PhD in analytical chemistry from the Universidad Complutense de Madrid (Spain) in 2004. Since 2005 she works as Assistant Professor at the Analytical Chemistry Department of the Chemistry Faculty of the Universidad Complutense de Madrid where she collaborates in the "Electroanalysis and Electrochemical (Bio)sensors" research group headed by Prof. J.M. Pingarrón. She worked as a Research Scholar in the research group of Prof. J. Wang at the Department of Nanoengineering in UCSD (USA) from January 2010 to July 2011. Her areas of interest include the development of enzymatic, immuno and DNA electrochemical sensors and advanced nanomachines.



María Pedrero received her PhD in Chemical Sciences (Analytical Chemistry) in 1993 from the Universidad Complutense de Madrid. In 1994 she stayed at the New Mexico State University for her postdoctoral training with Prof. Joseph Wang. Since 1991, she has been working in the Analytical Chemistry Department of the Chemistry Faculty of this University, where she is Professor of Analytical Chemistry since 2002. She collaborates in the "Electroanalysis and Electrochemical (Bio)sensors" research group. Her areas of interest include the development of enzymatic, immuno and DNA electrochemical sensors, bioelectrocatalysis, and electrode modification. She is co-author of more than sixty research papers.

SUPPORTING INFORMATION

ULTRASENSITIVE AMPEROMETRIC MAGNETOIMMUNOSENSOR FOR HUMAN C-REACTIVE PROTEIN QUANTIFICATION IN SERUM

Berta Esteban-Fernández de Ávila¹, Vanessa Escamilla-Gómez¹, Susana Campuzano¹, María Pedrero¹, J.-Pablo Salvador^{2,3}, M.-Pilar Marco^{2,3} and José M. Pingarrón^{1*}

¹Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain. ²Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D). ³CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain.

E-mails: berta.efa@quim.ucm.es, vaneeg@quim.ucm.es, susanacr@quim.ucm.es,
mpedrero@quim.ucm.es, pingarro@quim.ucm.es. Tel. 34913944315, fax 34 913944329.
jpablo.salvador@iqac.csic.es; pilar.marco@cid.csic.es; Tel. 0034 934006100

CONTENTS	PAGE
Table S1	S2
Determination of the dissociation constant (K_d)	S2–S3
References	S3–S4

Table S1. Analytical characteristics of different commercial ELISA assays for CRP determination.

Methodology	Dynamic range	LOD	Assay time [a]	Reference
ELISA assays (sandwich format)	0-0.1 mg L ⁻¹	0.1 mg L ⁻¹	1 h 30 min	[1]
	59.4-3800 pg mL ⁻¹	28.6 pg mL ⁻¹	2 h 15 min	[2]
	0-0.1 mg L ⁻¹	0.01 mg L ⁻¹	1 h 45 min	[3]
	0.156-10 ng mL ⁻¹	0.066 ng mL ⁻¹	3 h 20 min	[4]
	0.625-40 ng mL ⁻¹	0.156 ng mL ⁻¹	3 h 30 min	[5]
	0.156-10 ng mL ⁻¹	0.039 ng mL ⁻¹	4 h	[6]
	0.78-50 ng mL ⁻¹	0.78 ng mL ⁻¹	1 h 15 min	[7]
	0.156-10 ng mL ⁻¹	0.064 ng mL ⁻¹	1 h 15 min	[8]
	10-0.15 ng mL ⁻¹	150 pg mL ⁻¹	1 h 10 min	[9]
	2.47-600 pg mL ⁻¹	2 pg mL ⁻¹	2 h 50 min	[10]
	5-100 ng mL ⁻¹	5 ng mL ⁻¹	1 h 10 min	[11]
Magneto- immunosensor	0.07-1.000 ng mL ⁻¹	0.021 ng mL ⁻¹	1 h 35 min	This work

[a] Considering only the time required to carry out the corresponding immunological reaction and the detection step.

Determination of the dissociation constant (K_d)

The avidity of the antigen-antibody interaction was estimated. Thus, the K_d value between CRP and anti-CRP was calculated by ELISA by coating CRP and putting it in contact with different concentrations of biotinylated antibody (biotin-antiCRP). The obtained result

revealed an isotherm binding graph (Figure S1). The parameters of adjustment obtained were $K_d=4.75$ nM, and $B_{max}=2.54$ with a $r^2=0.98$, according to the following equation:

$$Y = \frac{B_{max}x}{K_d + x}$$

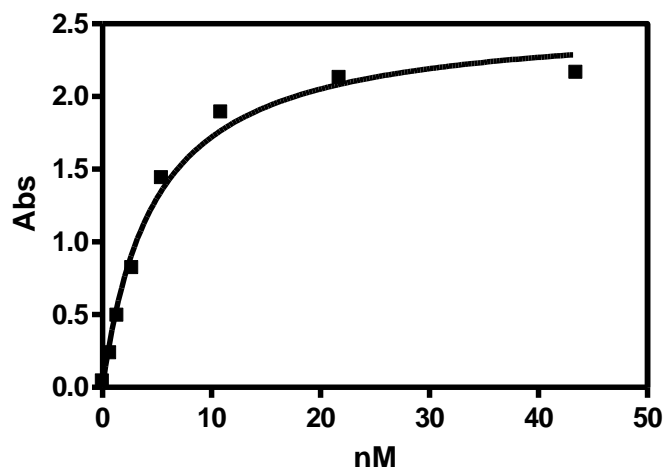


Fig. S1. Isotherm binding graph corresponding to the absorbance value measured as a function of the concentration of CRP.

References

[1] Abnova, catalog number KA0238

http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA0238

[2] Abnova, catalog number KA1052

http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA1052

[3] Abnova, catalog number KA3148

http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?catalog_id=KA3148

[4] Antibodies, catalog number ABIN414400

<http://www.antibodies-online.com/kit/414400/C-Reactive+Protein+CRP+ELISA/>

[5] Antibodies, catalog number ABIN366539

<http://www.antibodies-online.com/kit/366539/High+Sensitivity+CRActive+Protein+hs-CRP+ELISA/>

[6] Antibodies, catalog number ABIN454848

<http://www.antibodies-online.com/kit/454848/C-Reactive+Protein+CRP+ELISA/>

[7] Biorbyt, catalog number orb54806

http://www.biorbyt.com/human-c-reactive-protein-elisa-kit?_SID=U

[8] Biorbyt, catalog number orb52949

http://www.biorbyt.com/human-c-reactive-protein-crp-elisa-kit?_SID=U

[9] eBioscience, catalog number 88-7502

<http://www.ebioscience.com/human-c-reactive-protein-elisa-kit.htm>

[10] Abcam, catalog number ab99995

<http://www.abcam.com/C-Reactive-Protein-Human-ELISA-Kit-1-x-96-Well-Plate-ab99995.html>

[11] Hycult biotech, catalog number HK358

<http://www.hycultbiotech.com/acute-phase-proteins-crp-human-elisa-kit-p11574.html>

**Multiplexed determination of
amino-terminal pro-B-type natriuretic
peptide and C-reactive protein cardiac
biomarkers in human serum
at a disposable electrochemical
magnetoimmunosensor**

Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.;
Lanzone, V.; Campuzano, S.; Pedrero, M.; Compagnone, D.;
Pingarrón, J. M.



Vol. 26 p. 254–261, 2014

Multiplexed Determination of Amino-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide and C-Reactive Protein Cardiac Biomarkers in Human Serum at a Disposable Electrochemical Magnetoimmunosensor

Berta Esteban-Fernández de Ávila,^[a] Vanessa Escamilla-Gómez,^[a] Valentina Lanzone,^[b] Susana Campuzano,^[a] María Pedrero,^[a] Dario Compagnone,^[b] and José M. Pingarrón^{*,[a]}

Abstract: A rapid magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of two cardiac biomarkers, amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and C-reactive protein (CRP), in human serum is described. Specific capture antibodies were covalently immobilized onto carboxylic acid-modified magnetic beads. The quantification of NT-proBNP and CRP was performed by using indirect competitive and sandwich con-

figurations, respectively, and horseradish peroxidase-labeled tracers. The use of dual screen-printed carbon electrodes allowed the achievement of simultaneous independent amperometric readout for each cardiac biomarker. The developed methodology showed very low limits of detection (0.47 ng mL^{-1}). An international standard for CRP serum spiked with NT-proBNP was analyzed to evaluate the usefulness of the magnetoimmunosensor.

Keywords: NT-proBNP • CRP • Amperometric magnetoimmunosensors • Dual screen-printed electrodes • Human serum

1 Introduction

Cardiovascular diseases (CVDs) are the major cause of death among adults worldwide. Electrocardiograms (ECG), the first test when a patient suffering from chest pain goes to the doctor, lack of the required sensitivity. During recent years, several protein biomarkers have been associated with increased relative risk for cardiovascular events and could potentially add predictive value to establish risk factor sets [1]. Standard assays to detect cardiac biomarkers, like enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), are sensitive but suffer from important sample and reagent consumption in large-scale studies. Moreover, they are performed in central laboratories of clinics and hospitals and take a long time, which is highly incompatible with the quick decisions needed to save a heart attack patient [2].

In this context, electrochemical immunosensors can be envisaged as a valid alternative to classical methods of analysis for clinical biomarkers offering the advantages of being easy to use, rapid, robust, often inexpensive and capable of multianalyte testing and useful to facilitate point-of-care testing (POCT) [3,4].

Some immunosensors combined with various electrochemical transducers have been described to detect the levels of cardiac biomarkers in clinical samples. However, some cardiac markers can also work as some types of cancer detectors and most cardiovascular diseases have more than one marker associated with their incidence. Due to the limited specificity, the measurement of a single cardiac biomarker is usually not enough to diag-

nose heart problems, so that multiplexed immunoassays to accomplish the simultaneous detection of several cardiac biomarkers are attracting much attention to provide a more accurate diagnostic tool and enhance significantly the predictive value for the risk factor [5,6]. Furthermore, multiplex immunoassays are also advantageous because they offer higher sample throughput, simplified analytical procedures, less sample consumption, reduced turnaround times, improved test efficiency, and a more reasonable cost compared to traditional in-parallel single-analyte immunoassays [7,8]. Some electrochemical immunosensors and immunoassays have been implemented for the simultaneous detection of clinical biomarkers which pair the sensitivity of electrochemistry and the specificity of antibodies with low cost fabrication and robust designs [9,10].

Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) and C-reactive protein (CRP) are considered as two very promising biomarkers for cardiac risk prediction [1,11]. However, the clinically relevant cut-off concentrations for NT-proBNP and CRP differ by three orders of

[a] B. E.-F. d. de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J. M. Pingarrón
Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain
*e-mail: pingarro@quim.ucm.es

[b] V. Lanzone, D. Compagnone
Department of Biosciences and Technology for Food Agriculture and Environment, University of Teramo, via Carlo R. Lerici 1, 64023 Mosciano S. Angelo (Teramo), Italy

magnitude, and in extreme cases their serum concentrations could in principle differ by more than six or seven orders of magnitude [1], making their simultaneous detection in the same sample using the same device without different sample dilutions to cluster analytes into narrower concentration ranges, challenging.

In this work, we describe the first electrochemical magnetosensor for the simultaneous determination of CRP and NT-proBNP. The implemented methodology, involved the use of antigen (NT-proBNP) and capture antibody (antiCRP) modified magnetic beads (MBs) and the development of indirect competitive and sandwich configurations to perform the determination of NT-proBNP and CRP, respectively, allowing concurrent electrochemical measurement of both target analytes in a single multiplexed assay. NT-proBNP and antiCRP-modified MBs were incubated in a solution containing both analytes and a fixed concentration of specific detector antibodies. Accordingly, a HRP-labelled antibody was used for NT-proBNP while a biotinylated antibody together with a streptavidin-HRP conjugate was used for CRP detection. Upon the magnetic capture of the MBs bearing the immunoconjugate for each biomarker on each of the working electrodes at the dual screen-printed carbon electrodes (SPdCEs), quantification was achieved through the amperometric monitoring of the enzyme reaction product using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. Once the dual magnetosensor performance was evaluated, it was successfully applied to the analysis of an international standard for CRP serum spiked with NT-proBNP.

2 Experimental

2.1 Apparatus and Electrodes

Amperometric measurements were carried out with an Inbea bi-amperometric detector using the software Ib-

Graph which allows two amperometric measurements to be performed simultaneously. All measurements were carried out at room temperature. The transducers were SPdCEs (DRP-C1110, DropSens) consisting of two elliptic carbon working electrodes (6.3 mm^2 each), a carbon counter electrode and a Ag pseudo-reference electrode. A specific cable connector (ref. DRP-BICAC from DropSens, S.L.) acted as interface between the SPdCEs and the potentiostat. The capture of the modified-MBs on these SPdCEs surface was made after positioning the disposable electrodes on a homemade magnet holding block (see Figure 1). A P-Selecta (Scharlab) ultrasonic bath and an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A., Scharlab) were also employed. Homogenization of the solutions was facilitated with a Bunsen AGT-9Vortex. Magnetic separation steps for incubation/washing processes were performed using a Dynal MPC-S (product No. 120.20, Dynal Biotech ASA, Norway) magnetic particle concentrator.

2.2 Reagents and Solutions

Carboxylic acid-modified MBs (HOOC-MBs , $2.8\text{ }\mu\text{m}$, 10 mg mL^{-1} , $2 \times 10^9\text{ beads mL}^{-1}$, Dynabeads M-270 Carboxylic Acid) were purchased from Dynal Biotech ASA. 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), NaCl, KCl, Tween20, sodium di-hydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate, and Tris-HCl were purchased from Scharlab. *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimide (EDC), *N*-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS) and ethanolamine were purchased from Sigma-Aldrich.

NT-proBNP (Cat 8NT2) and HRP-conjugated mouse monoclonal antiNT-proBNP (HRP-antiNT-proBNP, Cat 4MT1C) were purchased from Hytest Ltd. Anti-human C-reactive protein antibody (antiCRP) and human C-reactive protein (CRP) were kindly provided from Audit Diagnostics. It is important to remark that a new CRP solution was prepared daily from a small concentrated aliquot kept frozen at -40°C due to the short biological

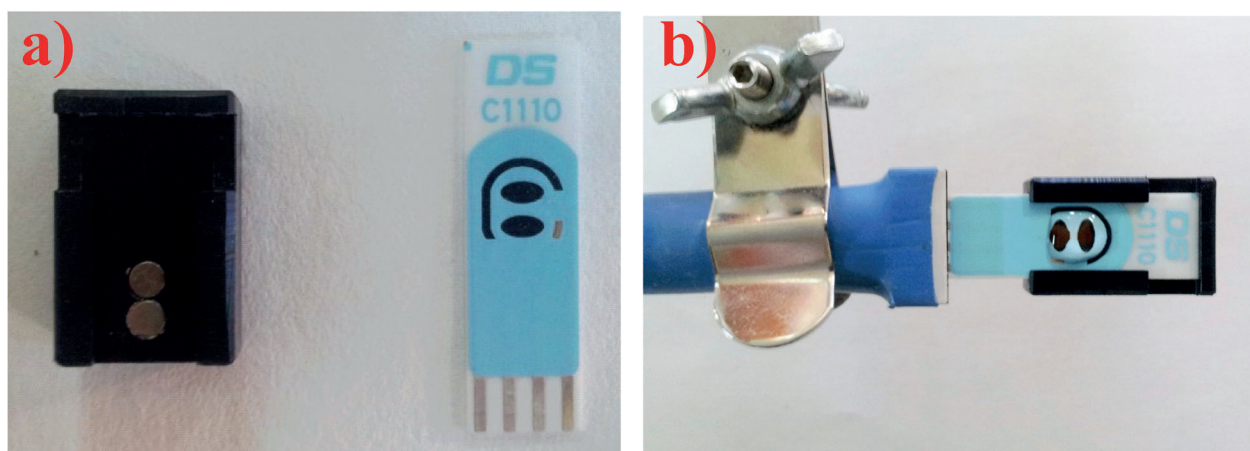


Fig. 1. Picture showing the SPdCE and the homemade magnet holding block (a), and the modified MBs on the SPdCE assembled on the magnet holding block and in the specific cable connector (b).

half-life time of CRP (less than 24 h) [12]. Biotin-conjugated-antiCRP (biotin-antiCRP) was prepared by using EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) according to the protocol described by Esteban-Fernández de Ávila et al [13]. A high sensitivity Streptavidin-HRP (Strep-HRP) conjugate from Roche (Ref: 11089153001, 500 U mL⁻¹) and TMB-H₂O₂ K-Blue reagent solution from Neogen in a ready-to-use reagent format (K-Blue enhanced-activity substrate, also containing H₂O₂) were also used.

Moreover, a WHO 1st International Standard for Human C-reactive protein (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC, code: 85/506), containing nominally 100 µg mL⁻¹ CRP was used as the sample reference material.

The following solutions prepared in deionized water were also employed: 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0; 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0; phosphate-buffered saline (PBS) consisting of 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5; 0.025 M MES buffer, pH 5.0; 0.01 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.5, PBST) consisting of PBS with 0.05 % Tween20, and 0.1 M Tris-HCl buffer, pH 7.2.

Activation of the HOOC-MBs was carried out with an EDC/sulfo-NHS mixture solution (50 mg mL⁻¹ each in MES buffer, pH 5.0). The blocking step was accomplished with a 1 M ethanolamine solution prepared in a 0.1 M phosphate buffer solution of pH 8.0.

All chemicals used were of analytical-reagent grade, and deionized water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm).

2.3 Immunosensor Preparation and Immunoassay Procedure

The developed methodology involved the use of two different modified MBs: antiCRP-MBs and NT-proBNP-MBs.

A 3-µL aliquot of the HOOC-MBs commercial suspension was transferred into a 1.5 mL eppendorf tube. Then, the MBs were washed twice with 50 µL MES buffer solution during 10 min under continuous stirring (600 rpm, 25 °C). Between each step the particles were concentrated using a magnet and, after 4 min, the supernatant was discarded. The MBs carboxylic groups were activated by incubation during 35 min in 25 µL of the EDC/sulfo-NHS mixture solution. The activated MBs were washed twice with 50 µL of MES buffer and incubated in 25 µL of 5 µg mL⁻¹ NT-proBNP (NT-proBNP-MBs) or 50 µg mL⁻¹ antiCRP (antiCRP-MBs) solutions (both prepared in MES buffer) during 60 min at 25 °C under continuous stirring (600 rpm.). Subsequently, the antiCRP-MBs and the NT-proBNP-MBs were washed twice with 50 µL of MES buffer solution. Thereafter, the unreacted activated groups on the MBs were blocked by adding 25 µL of a 1 M ethanolamine solution in 0.1 M phosphate buffer, pH 8.0, and incubating the suspension under continuous stirring (600 rpm) for 60 min at 25 °C. After two washing

steps with 50 µL of 0.1 M Tris-buffer (pH 7.2) and another one with 50 µL of PBST (pH 7.5), the NT-proBNP-MBs or the antiCRP-MBs were re-suspended in 25 µL of a solution containing the two analytes (NT-proBNP and CRP) and 1.0 µg mL⁻¹ of the antiNT-proBNP-HRP (NT-proBNP-MBs) or 1.0 µg mL⁻¹ of the biotin-antiCRP and (1:1000) of the Strep-HRP conjugate for the antiCRP-MBs (all solutions were prepared in PBST, pH 7.5). These mixture solutions were prepared previously and allowed reacting for 30 min. Upon 45 min incubation in the mixture of the two analytes and detector antibody solution at 25 °C under stirring (600 rpm), the resulting modified-MBs were washed twice with 50 µL of PBST buffer solution (pH 7.5). Finally, the modified-MBs were resuspended in 5 µL of 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0).

2.4 Amperometric Measurements

The amperometric measurements at the dual immunosensor were performed as follows: 5 µL of the NT-proBNP modified magnetic beads were magnetically captured on one of the working electrodes of the SPdCEs (WE 1 in Figure 2) and 5 µL of the CRP modified magnetic beads were captured on the second working electrode (WE 2 in Figure 2) by keeping the SPdCE in an horizontal position after placing it in the homemade magnet holding block shown in Figure 1. Subsequently, 50 µL of the ten times diluted TMB-H₂O₂ commercial substrate was dropped covering the two working electrodes as well as the counter and pseudo-reference electrodes. The current was recorded during 200 s at -0.1 V vs. the Ag pseudo-reference electrode and the values measured at 200 s were employed as the analytical signals.

Unless otherwise indicated, the reported data corresponded to the average of at least three replicates. A new SPdCE was used for each measurement.

2.5 Analysis of a Certified Serum Sample

The magnetoimmunosensor was applied to the analysis of a 100-times diluted International Standard for CRP which was spiked with 1 ng mL⁻¹ NT-proBNP. The simultaneous determination of NT-proBNP and CRP was performed after an additional 10-times dilution with PBST. The NT-proBNP-MBs or antiCRP-MBs, prepared as described in Section 2.3, were incubated each for 45 min in 25-µL aliquots of the 10-times diluted serum samples containing the two analytes and supplemented with the antiNT-proBNP-HRP, in the case of NT-proBNP determination, or the mixture formed with biotin-antiCRP and the Strep-HRP polymer for the CRP determination. Following washing, the resuspension and measurement steps were similar to those described in Sections 2.3 and 2.4.

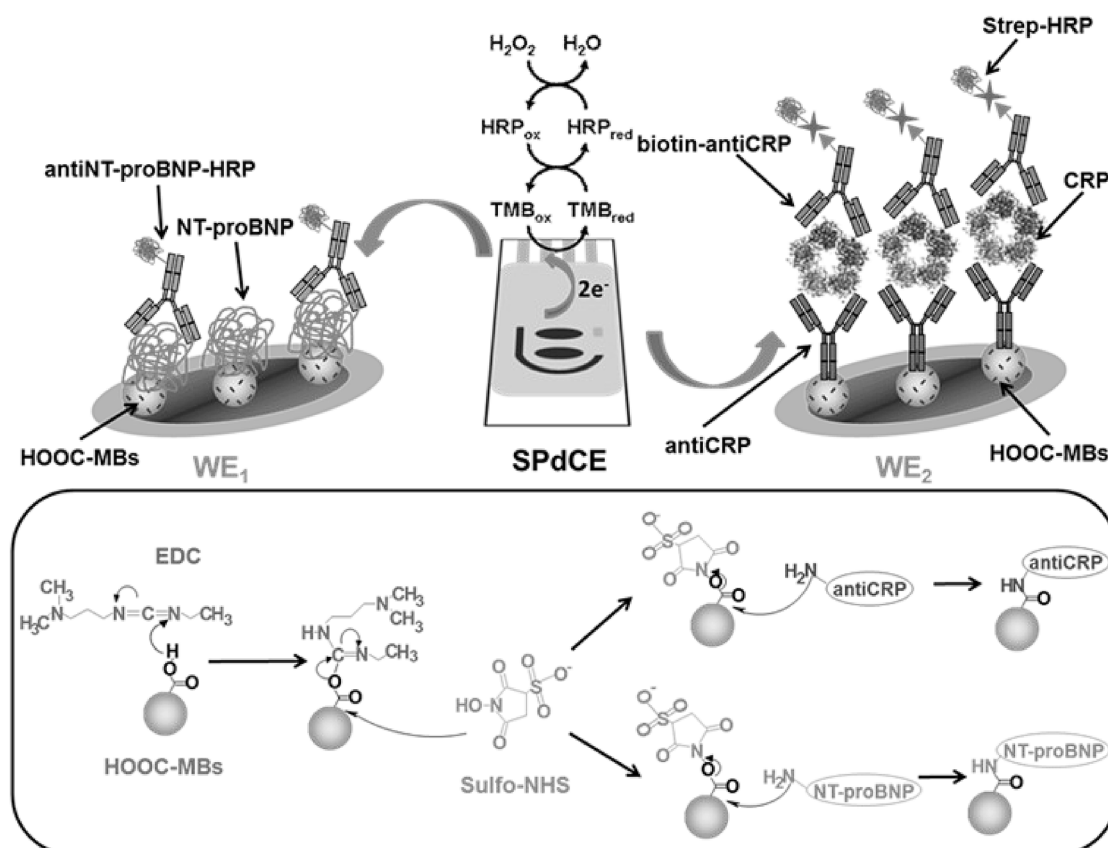


Fig. 2. Schematic display of the fundamentals involved in the development of the disposable dual magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of NT-proBNP and CRP. Bottom inset: details of the surface chemistry involved in the modification of the HOOC-MBs including the activation with EDC/sulfo-NHS and covalent binding of antiCRP or NT-proBNP.

3 Results and Discussion

The rationale of the multiplexed disposable electrochemical magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of NT-proBNP and CRP cardiac biomarkers is displayed in Figure 2. In brief, antigen or capture antibody-modified HOOC-MBs and indirect competitive or sandwich immunoassay configurations were used for the determination of NT-proBNP and CRP, respectively. NT-proBNP or antiCRP were immobilized on the HOOC-MBs previously activated with EDC/sulfo-NHS derivatives, followed by a blocking step of the unreacted MBs activated groups with an ethanolamine solution. The modified MBs were subsequently incubated in a mixture solution containing both cardiac biomarkers and a fixed concentration of the corresponding detection antibody: anti-NT-proBNP-HRP for NT-proBNP or biotin-antiCRP and Strep-HRP for CRP. After capturing the final modified MBs for each biomarker on the surface of each of the two working electrodes of the SPdCEs (WE 1 and WE 2 in Figure 2), the affinity reactions were monitored amperometrically using TMB as electron transfer mediator and H_2O_2 as the HRP substrate. It is important to note that the employed methodology implied that the SPdCEs acted only as the electrochemical transducer

while all the immunoreactions occurred on the surface of the MBs, thus minimizing unspecific adsorptions of the immunoreagents on the electrode surfaces.

3.1 Optimization of the Experimental Variables

The optimization of the variables involved in the functioning of the dual magnetoimmunosensor was performed using known concentrations of CRP and NT-proBNP and considering the results obtained with the single immunosensors constructed for the individual detection of the cardiac biomarkers [13,14]. The selected values are summarized in Table 1.

Apart from the variables implied in the functioning of each single immunosensor, the dilution factor of the TMB/ H_2O_2 commercial solution that covered all the electrodes (see Section 2.4) was also optimized taken CRP as the analyte. Figure 3 shows the comparison of the currents measured at -0.1 V after 200 s for 100 and 0.0 ng mL^{-1} CRP (blank signal). As it could be expected, both currents increased significantly with the concentration of the TMB/ H_2O_2 solution with the largest signal-to-blank ratio being obtained for a 10 dilution factor. Therefore, this dilution was performed to carry out the ampero-

Table 1. Experimental variables selected for the preparation of the dual electrochemical magnetoimmunosensor for NT-proBNP and CRP biomarkers.

Experimental variable	Selected value
V_{MBs} (μL)	3
[antiCRP] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	50
[biotin-antiCRP] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1
[Strep-HRP] (dilution factor)	1:1000
$t_{\text{mixture solution}}$ (min) [a]	30
$t_{\text{mixture solution incubation}}$ (min) [b]	45
[NT-proBNP] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	5
[antiNT-proBNP-HRP] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	1

[a] Preincubation time of the mixture solution (600 rpm, at 25 °C) containing both analytes and the antiNT-proBNP-HRP or the biotin-antiCRP and the Strep-HRP, for the NT-proBNP and CRP determination, respectively. [b] Modified-MBs incubation time in the mixture solution.

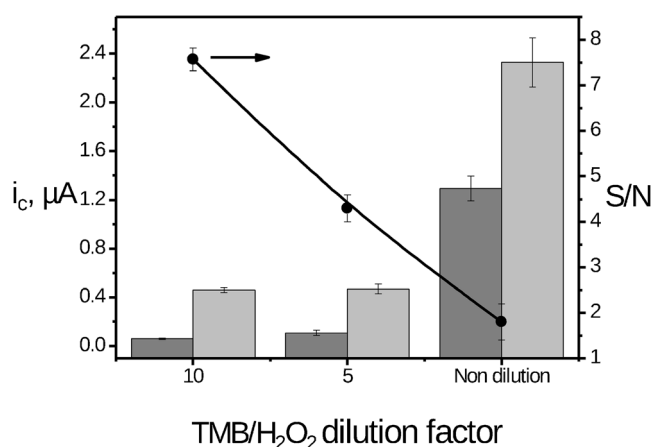


Fig. 3. Amperometric responses measured in the absence (dark grey bars) and in the presence of 100 ng mL⁻¹ CRP (light grey bars) as a function of the TMB/H₂O₂ dilution factor. Supporting electrolyte: 0.1 M sodium phosphate solution, E_{app} : -0.10 V vs. Ag pseudo-reference electrode. Other experimental conditions summarized in Table 1. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

metric detection. Moreover, an important decrease in the reproducibility of the measurements (see Figure 3) and a sharp TMB photosensitivity was observed for higher TMB/H₂O₂ concentrations.

The possible diffusion of the electroactive indicator to adjacent electrodes is considered as a potential major drawback to be solved in the design of electrochemical multisensory platforms [15]. Therefore, the possible cross-talk between the two working electrodes of the SPdCE, which would lead to false results, was evaluated under the optimized conditions. Figure 4 shows the amperometric measurements obtained with the dual magnetoimmunosensor in the absence and presence of CRP and NT-proBNP. As it can be seen, no significant cross-talking

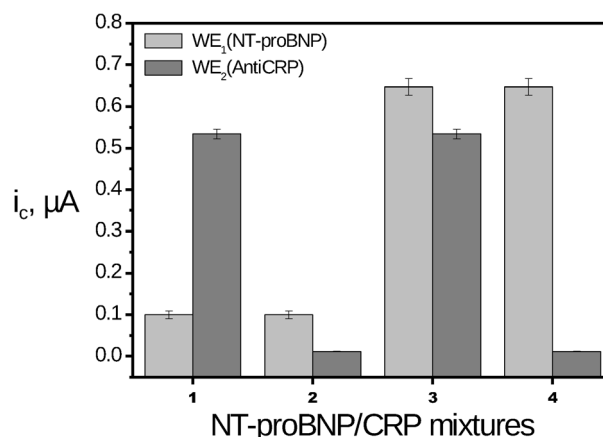


Fig. 4. Simultaneous amperometric responses measured at the dual immunosensor for: 4000 ng mL⁻¹ NT-proBNP and 100 ng mL⁻¹ CRP (1); 4000 ng mL⁻¹ NT-proBNP and no CRP (2); 100 ng mL⁻¹ CRP and no NT-proBNP (3); absence of both cardiac biomarkers (4). E_{app} = -0.10 V vs. Ag pseudo-reference electrode. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$).

was produced (even for a very large NT-proBNP concentration in the case of the CRP measurement) which endorsed the viability of the dual magnetoimmunosensor for the suitable simultaneous detection of both cardiac biomarkers.

3.2 Analytical Characteristics

The analytical performance of the dual magnetoimmunosensor was evaluated under the optimized working conditions by keeping one of the analytes at a constant concentration while the concentration of the other changed in order to obtain the dose-response curve, dynamic range and precision for each analyte. The constructed calibration graphs displayed in Figure 5 show the expected shape for sandwich and competitive configurations.

The CRP calibration plot showed a linear range between 2.0 and 100 ng mL⁻¹ and was fitted to the following linear equation:

$$I \text{ (A)} = 3.86 \times 10^{-7} \log [\text{CRP}] \text{ (ng mL}^{-1}\text{)} - 2.40 \times 10^{-7}$$

with a correlation coefficient of 0.996. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were estimated according with the $3s/m$ and $10s$ criteria, respectively, where m is the slope of the linear calibration plot, and s was estimated as the standard deviation of the amperometric signals obtained for 3.0 ng mL⁻¹ CRP. The obtained values were 0.47 and 1.56 ng mL⁻¹, respectively.

Regarding the calibration curve for NT-proBNP, the amperometric measurements were normalized according to:

$$S_n = (i - i_\infty) / (i_0 - i_\infty)$$

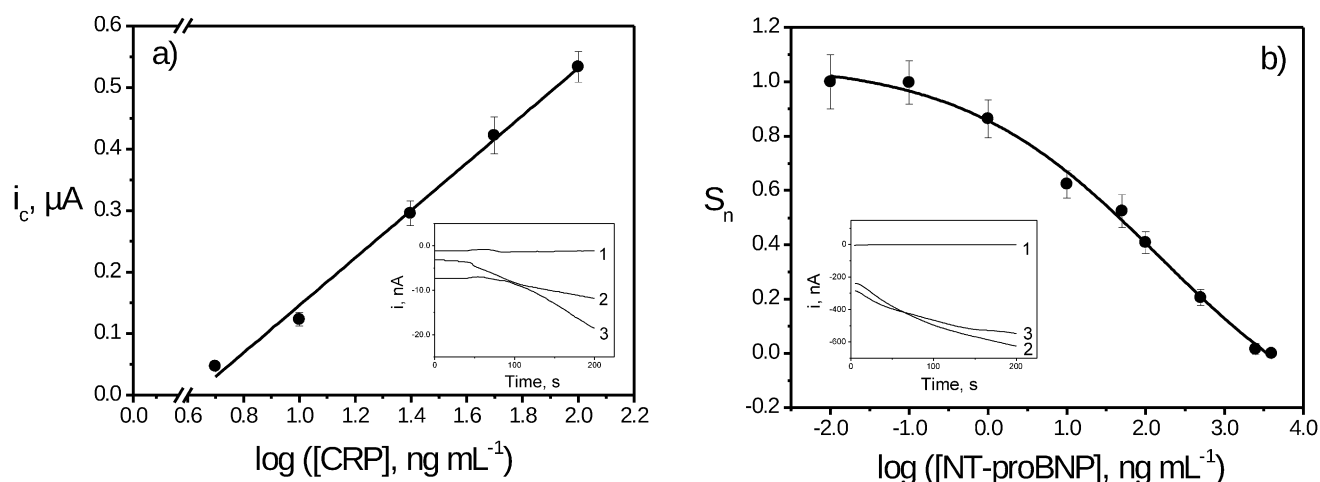


Fig. 5. Calibration curves constructed for CRP (in the presence of 100 ng mL⁻¹ NT-proBNP) (a), and for NT-proBNP (in the presence of 100 ng mL⁻¹ CRP) (b) in PBST 10 mM, pH 7.5. E_{app} : -0.10 V vs. Ag pseudo-reference electrode. Other experimental conditions summarized in Table 1. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$). Insets: Amperometric traces recorded simultaneously at the dual magnetoimmunosensor in the absence of tracer (lines 1), without target analytes (lines 2) and in the presence of both analytes at a 1 ng mL⁻¹ concentration level (lines 3).

where i corresponded to the current measured for a given analyte concentration, i_{∞} is the current measured in the presence of an excess of NT-proBNP, and i_0 is the blank current in the absence of NT-proBNP. The calculated normalized signals (S_n) were plotted as a function of the logarithm of the analyte concentration (in ng mL⁻¹ units), and the experimental data were fitted to the following four-parameter dose-response equation (sigmoidal):

$$S_n = i_{\min} + (i_{\max} - i_{\min}) / (1 + 10^{(\log IC_{50} - x)h})$$

where x is the analyte concentration, i_{\max} is the asymptotic maximum current in absence of analyte, h is the slope value at the inflection point, IC_{50} is the analyte concentration at the inflection point (concentration giving 50% inhibition of i_{\max}), and i_{\min} is the asymptotic minimum current [16]. The IC_{50} corresponded to 47.0 ng mL⁻¹ and a dynamic range (DR) from 2.5 to 504 ng mL⁻¹ was calculated as the analyte concentration interval for which the amperometric signal was between 20 and 80% of the maximum signal. A LOD of 0.47 ng mL⁻¹ was calculated as the analyte concentration for which the maximum amperometric signal was reduced by 10%.

These analytical characteristics are slightly worse than those achieved with the magnetoimmunosensors developed for the individual determination of CRP [13] and NT-proBNP [14]. This is most likely due to the smaller active surface area of the working electrodes in the SPdCEs in comparison with the single SPCEs (12.6 vs. 6.3 mm²). However, it is important to remark that the LODs achieved for both analytes with the dual magnetoimmunosensor are below the clinical thresholds recommended for each biomarker in serum/plasma samples (1000 and 1 ng mL⁻¹ for CRP and NT-proBNP, respec-

tively) therefore fulfilling the requirements for the analysis of clinical samples.

The reproducibility of the responses obtained with different dual magnetoimmunosensors constructed using the same protocol for 25 ng mL⁻¹ CRP and 50 ng mL⁻¹ NT-proBNP was evaluated. The amperometric measurements made with 10 dual magnetoimmunosensors yielded relative standard deviation (RSD) values of 6.3 and 9.4%, respectively. These results confirmed that the whole dual magnetoimmunosensor fabrication procedure, including the MBs modification, their magnetic capture on the surface of each of the two SPdCEs working electrodes, and the amperometric measurements, were reliable and that reproducible amperometric responses can be obtained with different immunosensors constructed in the same manner.

3.3 Application to the Analysis of a Certified Human Serum

The applicability of the developed methodology for clinical analysis was evaluated by analyzing an International Standard for CRP serum (containing nominally 1 μg mL⁻¹ CRP) spiked with NT-proBNP. No significant matrix effect was observed with this serum for the analysis of CRP after a 1/10 sample dilution [13]. Moreover, the possible existence of matrix effect for the determination of NT-proBNP was also evaluated. So, a calibration plot for NT-proBNP was constructed by diluting the International Standard serum 10 times with PBST and spiking with NT-proBNP ranging from 0 to 4000 ng mL⁻¹ (Figure 6). The analytical characteristics of this calibration plot, calculated according to the equation shown above yielded a DR between 0.53 and 193 ng mL⁻¹, an IC_{50} of 11.73 and a LOD of 0.09 ng mL⁻¹. As it can be seen, the LOD ach-

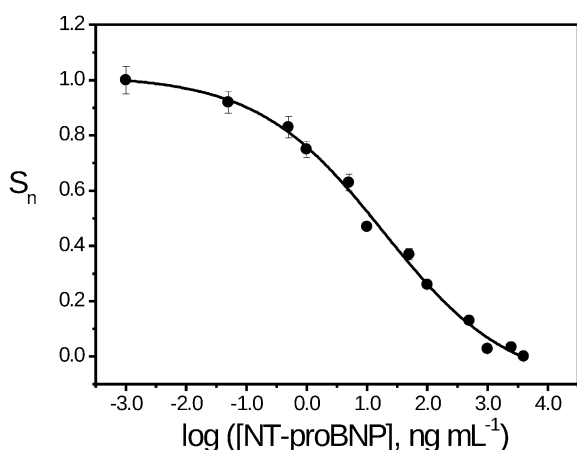


Fig. 6. Calibration curve constructed for NT-proBNP by spiking an international standard for CRP serum diluted 10 times with PSBT with different analyte concentrations. Error bars estimated as a triple of the standard deviation ($n=3$). Experimental conditions as described in Table 1 (selected values column).

ieved is remarkably lower than that calculated in buffered standard solutions, which is most likely due to a more effective blocking of the remaining free activated HOOC-MBs sites by some of the serum components.

According to these results, the determination of CRP and NT-proBNP in the standard CRP serum spiked with a known concentration of NT-proBNP (1.0 ng mL^{-1}) was accomplished by interpolation the amperometric sample responses into the calibration plot constructed with CRP standards (Figure 5a) or into the calibration plot shown in Figure 6, respectively. The analysis of six replicates yielded mean contents of $(1.02 \pm 0.04) \mu\text{g mL}^{-1}$ CRP and $(1.0 \pm 0.1) \text{ ng mL}^{-1}$ NT-proBNP, the confidence intervals being calculated for $\alpha=0.05$. Therefore, these results confirmed the suitability of the disposable dual magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of both cardiac biomarkers at clinically relevant concentration levels in serum. It should be remarked that this determination was possible after a minimal sample treatment (just a dilution in the buffer solution) and in a total assay time of approximately 60 min once the antiCRP-MBs and NT-proBNP-MBs are prepared. It is also worth to remark that despite the huge differences in concentration between the two target analytes in the clinical sample, the developed dual magnetoimmunosensor allowed their determination to be performed in a single assay without splitting or need for using a different sample dilution for each quantification.

4 Conclusions

We report in this work the first disposable amperometric magnetoimmunosensor for the simultaneous determination of NT-proBNP and CRP in human serum by coupling an indirect competitive and a sandwich assay configuration using the same electrode platform, which makes it possible to match the clinically relevant concentration

ranges for both cardiac biomarkers. The dual amperometric magnetoimmunosensor exhibits excellent analytical performance in terms of sensitivity, selectivity and a wide range of quantifiable antigen concentrations. The performances of the individual assays are only slightly affected when combining them into the dual electrode platform and no cross-reactivity between both immunosensors was observed. The whole multiplexed immunoassay for 2 cardiac biomarkers could be completed in approximately 60 min. Moreover, the low cost and easy automation and miniaturization of the employed instrumentation, together with the use of disposable mass-produced electrodes make the developed approach a promising, attractive and user-friendly alternative diagnosis tool for the development of POC devices for onsite clinical diagnosis.

Acknowledgements

The financial support of the *Spanish Ministerio de Economía y Competitividad* Research Project, CTQ2012-34238, and the AVANSENS Program from the *Comunidad de Madrid* (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. A part of the work has been performed in the Project 120215-CAJAL4EU, in which the Spanish partners are funded by the *Spanish Ministry of Science and Innovation*, and the *ENIAC* Joint Undertaking. B. Esteban-Fernández de Ávila acknowledges a FPI fellowship from the *Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación*. The authors would like to acknowledge *Audit Diagnostics Company* for kindly providing the CRP protein and its specific capture and detector antibodies and *M. P. Marco Research Group* for the preparation of the biotin-antiCRP.

References

- [1] J. Melin, G. Rundström, C. Peterson, J. Bakker, B. D. Mac-Craith, M. Read, O. Öhman, C. Jönsson, *Anal. Biochem.* **2011**, 409, 7.
- [2] G.-J. Zhang, Z. H. H. Luo, M. J. Huang, J. J. Ang, T. G. Kang, H. Ji, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 28, 459.
- [3] Q. A. M. Al-Khafaji, M. Harris, S. Tombelli, S. Laschi, A. P. F. Turner, M. Mascini, G. Marrazza, *Electroanalysis* **2012**, 24, 735.
- [4] P. Skladal, *Electroanalysis* **1997**, 9, 737.
- [5] J. Park, V. Sunkara, T.-H. Kim, H. Hwang, Y.-K. Cho, *Anal. Chem.* **2012**, 84, 2133.
- [6] M. Hasanzadeh, N. Shadjou, M. Eskandani, M. de la Guardia, E. Omidinia, *Tr. Anal. Chem.* **2013**, 49, 20.
- [7] A. Qureshi, J. H. Niazi, S. Kallenpudi, Y. Gurbuz, *Biosens. Bioelectron.* **2010**, 25, 2318.
- [8] W. Lu, C. Fu, Y. Chen, J. Lu, Y. Yao, C. Shen, Z. Gu, *Plos One* **2012**, 7, e41448.
- [9] J. Wu, Y. Yan, F. Yan, H. Ju, *Anal. Chem.* **2008**, 80, 6072.
- [10] R. Polsky, J. C. Harper, D. R. Wheeler, S. M. Dirk, Du. C. Arango, S. M. Brozik, *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 23, 757.
- [11] Y. Zhuo, W.-J. Yi, W.-B. Lian, R. Yuan, Y.-Q. Chai, A. Chen, C.-M. Hu, *Biosens. Bioelectron.* **2011**, 26, 2188.
- [12] C. Foglar, R. W. Lindsey, *Orthopedics* **1998**, 21, 687.

- [13] B. Esteban-Fernandez de Ávila, V. Escamilla, S. Campuzano, M. Pedrero, J. M. Pingarrón, *Sens. Actuators B, Chem.* **2013**, 188, 212.
- [14] B. Esteban-Fernández de Ávila, V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J. M. Pingarrón, *Anal. Chim. Acta* **2013**, 784, 18.
- [15] V. Escamilla-Gómez, D. Hernández-Santos, M. Begoña González-García, J. M. Pingarrón-Carrazón, A. Costa-García, *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 2678.
- [16] V. Escamilla-Gómez, S. Campuzano, M. Pedrero, J. M. Pingarrón, *Electroanalysis* **2007**, 19, 1476.

Received: October 4, 2013

Accepted: November 7, 2013

Published online: December 16, 2013

Integrated amperometric immunosensor for lipoprotein (a) determination in human serum

Esteban-Fernández de Ávila, B.; Escamilla-Gómez, V.;
Campuzano, S.; Pedrero, M.; Salvador, J-P.; Marco, M-P.;
Pingarrón, J. M.

Submitted to *Analytical and Bioanalytical Chemistry*



Lipoprotein(a) determination in human serum using a nitrilotriacetic acid derivative immunosensing scaffold on disposable electrodes

Journal:	<i>Analytical and Bioanalytical Chemistry</i>
Manuscript ID:	ABC-00639-2014
Type of Paper:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	08-Apr-2014
Complete List of Authors:	Esteban-Fernández de Ávila, Berta; Universidad Complutense de Madrid, Campuzano, Susana; Universidad Complutense de Madrid, Química Analítica Pedrero, María; Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Química Analítica Salvador, J.-Pablo; CIBER-BBN/IQAC-CSIC, Marco, M.-Pilar; IQAC-CSIC/CIBER-BBN, Pingarrón, José; Complutense University of Madrid, Department of Analytical Chemistry
Keywords:	Lp(a), screen-printed electrode, integrated amperometric immunosensor, human serum

**LIPOPROTEIN(A) DETERMINATION IN HUMAN SERUM USING A
NITRILOTRIACETIC ACID DERIVATIVE IMMUNOSENSING SCAFFOLD ON
DISPOSABLE ELECTRODES**

Berta Esteban-Fernández de Ávila¹, Susana Campuzano^{1*}, María Pedrero¹, J.-Pablo Salvador²,
³, M.-Pilar Marco^{2,3} and José M. Pingarrón^{1*}

¹*Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas, Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain.* ²*Nanobiotechnology for Diagnostics (Nb4D).* ³*CIBER de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). Jordi Girona 18-26, 08034-Barcelona, Spain.*

E-mails: berta.efa@quim.ucm.es, susanacr@quim.ucm.es, mpedrero@quim.ucm.es,
pingarro@quim.ucm.es. Tel. 34913944315, fax 34 913944329.
jpablo.salvador@iqac.csic.es; pilar.marco@cid.csic.es; Tel. 0034 934006100

* to whom correspondence is to be addressed

Abstract

A novel strategy for the construction of a disposable integrated amperometric immunosensor for the sensitive and rapid determination of lipoprotein(a) (Lp(a)), an important predictor of cardiovascular disease risk, in human serum is reported. The approach use a sandwich format involving the covalent immobilization of selective capture antibodies (antiLp(a)) on the surface of a N-[N_α,N_α-Bis(carboxymethyl)-L-lysine]-12-mercaptododecanamide (HS-NTA)-modified screen-printed carbon electrodes (SPCEs). After a blocking step with skimmed milk, the modified antiLp(a)-SPCEs were incubated with a mixture solution containing the target analyte and a fixed concentration of a specific biotinylated antibody (biotin-antiLp(a)) and a Streptavidin-HRP (Strep-HRP) conjugate. The amperometric responses of the resulting immunosensor at -0.10 V (vs a Ag pseudo-reference electrode), upon addition of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as electron transfer mediator and H₂O₂ as the enzyme substrate, were used to monitor the extent of the immunoreactions. The developed methodology exhibited a wide range of linearity between 0.005 and 10 μg mL⁻¹, a low detection limit (LOD) of 8 ng mL⁻¹, and a great selectivity against other serum components. The usefulness of the Lp(a) immunosensor was demonstrated by analyzing spiked serum samples as well as a reference serum containing a certified Lp(a) content.

Keywords: Lp(a); screen-printed electrode; integrated amperometric immunosensor; human serum.

1
2
3 **1. Introduction**
4

5 Cardiovascular diseases (CVD) are the most common cause of death in European men
6
7 under 65 years and the second most common cause in women and represent the 3 % of all
8
9 deaths in North America. These facts suggested considering new strategies for its prediction,
10
11 prevention, and treatment [1].
12

13
14 Inflammatory mechanisms play a central role in the pathogenesis of atherosclerosis
15
16 and its complications [2]. It has been demonstrated that atherogenic lipoproteins such as
17
18 oxidized low-density lipoprotein (LDL), remnant lipoprotein (beta-VLDL), apo(B-100) and
19
20 lipoprotein(a) (Lp(a)) play a critical role in the proinflammatory reaction.
21

22
23 Lp(a) is an LDL-like molecule consisting of an apolipoprotein B-100 (apo(B-100))
24
25 particle attached by a disulphide bridge to another apolipoprotein called apo(a) [3] (see **Fig.**
26
27 **1**). Numerous studies have documented that high plasma Lp(a) concentrations are associated
28
29 with a variety of cardiovascular disorders, including peripheral vascular disease,
30
31 cerebrovascular disease, and premature coronary disease [4-6] and during the last few years,
32
33 major efforts have been focused on trying to elucidate their physiologic role and their
34
35 pathologic mechanisms of action [7, 8]. Although the serum concentration of this lipoprotein
36
37 may vary between 0-200 mg dL⁻¹, concentrations of Lp(a) exceeding 30 mg dL⁻¹ may increase
38
39 the risk of thrombus formation by impeding fibrinolytic mechanisms in the region of the
40
41 plaque. Also, because of the structural homology with plasminogen, Lp(a) may have
42
43 important antithrombotic properties, which could contribute to the pathogenesis of
44
45 atherothrombotic disease [9]. Apo(a) serves as a distinctive marker of Lp(a) and represents an
46
47 atherogenic component of Lp(a), and has also been reported to be correlated to coronary
48
49 artery disease [10] as well as renal disease [11]. Some prospective studies suggest that the
50
51 relation between Lp(a) concentration and the risk of CVD may involve a threshold and that
52
53 the association may be more marked among individuals with elevated LDL cholesterol [12].
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 In addition, patients with coronary artery disease (CAD) have levels of Lp(a) higher than 20
4 mg dL⁻¹ [13]. Therefore, it has been proposed that levels of Lp(a) may be an independent risk
5 factor for CAD and myocardial infarction [3]. Lp(a) may act also as a proinflammatory
6 mediator that augments the lesion formation in atherosclerotic plaques [14]. The relationship
7 between Lp(a) levels and the severity of coronary atherosclerosis in patients with unstable
8 angina or acute myocardial infarction (MI) has been analyzed in several studies [15].
9
10

11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Some studies suggest that periodical determination of Lp(a) values in subjects with
coronary disease may be useful in order to predict further acute vascular events [16]. Serum
Lp(a) levels ≥ 25 mg dL⁻¹ are noted in 67 % of patients with rapid progression of coronary
artery disease but in only 33 % of patients without progression of coronary artery disease.
Some recommendations stated that Lp(a) screening is not warranted for primary prevention
and assessment of cardiovascular risk at present, but that Lp(a) measurements can be useful in
patients with a strong family history of cardiovascular disease, or if risk of cardiovascular
disease is considered intermediate on the basis of conventional risk factors. The European
Atherosclerosis Society Consensus Panel [17] has suggested screening for elevated Lp(a) in
individuals at intermediate or high CVD/CHD risk, a level < 50 mg dL⁻¹ being considered as
desirable as a function of global cardiovascular risk.

Several types of Lp(a) assays are currently available; among them sandwich enzyme-
linked immunosorbent assays (ELISAs), non-competitive ELISAs, latex immunoassays,
immunonephelometric assays, and immunoturbidimetric and fluorescence assays must be
highlighted for their widespread use [18-20]. Although the methodologies based on
immune/antigen reactions are characterized by their selectivity, they also lack stability, imply
long analysis times and high costs, and they are not portable also demanding skilled
professionals. In this context, the development of new tools minimizing limitations imposed
by these methodologies and taking advantage of the high specificity of traditional

immunochemical methods is of great interest. In this sense, electrochemical immunosensors are envisaged as a valid alternative to classical methods of analysis for clinical biomarkers, because they are amenable to direct electrical readout, and are also well suited for rapid detection with high sensitivity and selectivity with low-cost instrumentation and adaptable to miniaturization. Also, electrochemical immunosensors can be used to facilitate point-of-care testing (POCT) and to undertake molecular analysis without the need for state-of-the-art laboratories.

In the last years, many efforts to achieve the immobilization of biological macromolecules on electrode surfaces have been done and, among the large variety of strategies described, covalent coupling of the biomolecules to chemical activated surfaces has been shown to be an attractive alternative to physical methods [21, 22] to improve the sensitivity and stability of electrochemical immunosensors. As an example, specific capture antibodies can be covalently immobilized on screen-printed carbon electrodes (SPCEs) modified with a dense layer of a tetradentate nitrilotriacetic acid (NTA) [23] which allows the functionalization of the SPCE surface with three -COOH moieties per NTA molecule adsorbed, and hence an effective and reproducible covalent immobilization of the antibodies through N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide/N-hydroxysulfosuccinimide (EDC/sulfo-NHS) chemistry [24].

This paper reports for the first time the development and analytical evaluation of a disposable integrated amperometric immunosensor for the sensitive and selective determination of Lp(a), aiming at the diagnosis of several cardiovascular diseases. A sandwich configuration and SPCEs functionalized with a NTA layer activated with an EDC/sulfo-NHS solution were employed as novel scaffolds for covalent capture antibody immobilization. The resultant antiLp(a)-SPCEs were incubated in the sample solution and the target protein was sandwiched with a biotinylated-detector antibody labeled in a final step

with a Streptavidin-HRP (Strep-HRP) conjugate. Quantification was achieved through the electrochemical monitoring of the enzyme product at the SPCEs, using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) as electron transfer mediator and H_2O_2 as the enzyme substrate. Once the integrated immunosensor performance was evaluated, it was successfully applied to the analysis of serum spiked samples as well as to a reference serum containing a certified amount of Lp(a).

2. Materials and methods

2.1 Apparatus and electrodes

Amperometric measurements were carried out with an ECO Chemie Autolab PGSTAT 101 potentiostat using the software package NOVA 1.7. A P-Selecta (Scharlab) ultrasonic bath and an Optic Ivymen System constant temperature incubator shaker (Comecta S.A., Scharlab) were also employed. Screen-printed carbon electrodes (SPCEs, DRP-C110, purchased from Dropsens) consisting of a 4-mm smooth carbon working electrode, a carbon counter electrode and an Ag pseudo-reference electrode, were used. A specific cable connector (ref. DRP-CAC from DropSens, S.L.) acted as the interface between the SPCEs and the potentiostat. Homogenization of the solutions was facilitated with a Bunsen AGT-9 Vortex.

2.2 Reagents and solutions

2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), NaCl, KCl, Tween[®]20, sodium dihydrogen phosphate, di-sodium hydrogen phosphate and Tris-HCl were purchased from Scharlab. N-[N_α,N_α-Bis(carboxymethyl)-L-lysine]-12-mercaptododecanamide (HS-NTA), N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide (EDC), N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-

NHS), boric acid and sodium tetraborate were purchased from Sigma-Aldrich. Sodium carbonate anhydrous was acquired from Panreac and sodium hydrogen carbonate was purchased from Scharlau.

Human C-reactive protein (CRP), Lp(a) and capture and detector antibodies against Lp(a) were kindly provided from Audit Diagnostics. Biotinylation of the detector antibody was carried out by using EZ-Link sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Pierce) according to the protocol described in *Section 2.3*. Human hemoglobin (H7379) and bilirubin (B4126) purchased from Sigma-Aldrich, bovine serum albumin (BSA-TYPE VH) from Gerbu, amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP, Cat 8NT2), human cardiac troponin T (cTnT, Cat 8T13) from Hytest Ltd, IgG from human serum (12511, Sigma-Aldrich), and D-dimer (ab35949, Abcam) were used to evaluate the selectivity of the developed immunosensor. A high sensitivity Streptavidin peroxidase (Strep-HRP) conjugate from Roche (Ref: 11 089 153 001, 500 U mL⁻¹) and a TMB-H₂O₂ K-Blue reagent solution from Neogen in a ready-to-use reagent format (K-Blue enhanced-activity substrate, also containing H₂O₂) were also used. Moreover, a progesterone-deficient human serum (S7394, Sigma), and a serum control containing 56.1 mg dL⁻¹ Lp(a) (Randox Laboratories), were used as sample materials.

All chemicals used were of analytical-reagent grade, and deionized water was obtained from a Millipore Milli-Q purification system (18.2 MΩ cm at 25 °C).

Other solutions employed, prepared in deionized water, were: borate buffer (0.2 M boric acid/sodium borate, pH 8.7); 0.05 M carbonate buffer, pH 9.6; 0.025 M MES buffer, pH 5.0; phosphate-buffered saline (PBS) consisting of 0.01 M phosphate buffer solution containing 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl, pH 7.5; 0.01 M sodium phosphate buffer solution (PBST), pH 7.5, consisting of PBS with 0.05 % Tween[®] 20 and 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0.

Stock solutions of Lp(a) were prepared daily in 0.025 M MES buffer, pH 5.0 from a small concentrated aliquot ($960 \mu\text{g mL}^{-1}$) kept frozen at -20°C .

A 1.5 mM HS-NTA solution prepared in 0.05 M carbonate buffer was used for functionalization of the SPCEs. Activation of the carboxylic groups was carried out with an EDC/sulfo-NHS mixture solution (50 mg mL^{-1} each prepared in MES buffer, pH 5.0). The blocking step was accomplished with a solution of skimmed milk purchased in a local supermarket diluted 1:1 with 10 mM PBS buffer, pH 7.5.

2.3 Detector antibody biotinylation

4 mg of detector antiLp(a) antibody were dissolved in 2 mL of borate buffer (0.2 M boric acid/sodium borate, pH 8.7) and 0.34 mg of sulfo-NHS-LC-LC-Biotin dissolved in 0.2 mL of deionized water were added. The reaction proceeded under continuous stirring for 4 h at room temperature. The labeled antibody was purified by dialysis and stored freeze-dried at -80°C . Working 0.66 mg mL^{-1} aliquots were prepared in 10 mM PBS (pH 7.5) and stored at -20°C .

2.4 Immunosensor preparation and immunoassay procedure

In order to functionalize the SPCEs with the NTA layer, 10 μL of a 1.5 mM HS-NTA solution (prepared in carbonate buffer) were deposited on the working electrode surface and incubated 2 h at 4°C . After washing with deionized water and drying with nitrogen, activation of the $-\text{COOH}$ moieties of the NTA-modified SPCE surface was carried out by placing a 10 μL drop of the EDC/sulfo-NHS mixture onto the working electrode and allowing reaction to proceed for 30 min at room temperature, followed by rinsing with MES buffer and drying under a nitrogen stream.

For the antiLp(a) covalent immobilization a 10 μL drop of antiLp(a) solution (200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in MES buffer) was deposited on the activated electrodes and incubated at 25 $^{\circ}\text{C}$ during 60 min. Subsequently, the antiLp(a)-modified SPCEs were washed with PBS to remove the unbound antibody, and dried under a nitrogen stream. Thereafter, the unreacted activated groups on the SPCEs were blocked by placing 10 μL of the 1:1 PBS diluted skimmed milk solution on the working electrode and incubating for 30 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. A mixture solution containing a variable concentration of Lp(a) and fixed concentrations of the specific biotinylated detector antibody (biotin-antiLp(a), 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and the Strep-HRP conjugate (1:1000), was prepared (in PBST, pH 7.5) and allowed the reaction to proceed for 30 min at 25 $^{\circ}\text{C}$. After a washing step with PBS buffer (pH 7.5), the antiLp(a)-SPCE was incubated during 15 min at room temperature with 10 μL of the mixture solution. Finally, the modified electrodes were thoroughly washed with 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) and dried under a nitrogen stream before the electrochemical measurements.

It should be mentioned that all the incubation steps were performed by placing the SPCE in a humid incubation chamber in order to avoid the evaporation of the drops deposited onto the working electrode surface.

2.5 Amperometric measurements

After depositing a 45 μL drop of 0.1 M sodium phosphate buffer solution (pH 7.0) onto the modified SPCE, amperometric measurements were carried out at an applied potential of -0.10 V vs the Ag pseudo-reference electrode. After stabilization of the blank current, 5 μL of the TMB- H_2O_2 solution [25] were deposited on the working electrode surface and the resulting current was recorded. The analytical signal was the current measured after 200 s of the TMB- H_2O_2 substrate addition.

Unless otherwise indicated, the reported data corresponded to the average of at least three replicates. A new SPCE was used for each measurement.

2.6 Analysis of human serum samples

A calibration plot for Lp(a) in the non-containing Lp(a) human serum sample matrix was constructed by spiking 40 times-diluted samples (in PBS, pH 7.5) with Lp(a) concentrations ranging from $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ to $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. An adequate mixing of the antigen and serum was assured by placing the samples in a vortex. A $10 \mu\text{L}$ drop of the spiked diluted serum sample supplemented with the optimal concentrations of the biotin-antiLp(a) and Strep-HRP conjugate ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and 1:1000, respectively) was deposited on the antiLp(a)-modified SPCEs prepared as described in Section 2.4, and incubated for 15 min at 25°C . Then, the modified SPCEs were washed following the same methodology described earlier for Lp(a) standards solutions.

The suitability of the immunosensor for the determination of Lp(a) in human serum was evaluated by analysing samples containing no target protein spiked with $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ (20 mg dL^{-1}) Lp(a), and diluting 40 times with PBST pH 7.5 solution until a final concentration of $5.0 \mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a) following the same steps described above. Furthermore, a reference serum containing a certified concentration of 56.1 mg dL^{-1} Lp(a) was analyzed. According to the instructions recommended by the supplier, the total content of the vial was reconstituted at room temperature with 1 mL of deionized water, left to stand for 30 min, totally dissolved by gentle swirling to avoid froth, and stored at 4°C . The determination of Lp(a) was performed after a 100-times dilution with PBST of pH 7.5 by applying the same procedure described above.

3. Results and discussion

SPCEs were modified with ordered physisorbed monolayers of a long alkyl chain NTA derivative. This modification protocol was recently employed by Conzuelo et al [26] demonstrating that similar adsorption occurred with a thiolated HS-NTA and its non-thiolated analogue, which allowed concluding that the thiol moiety did not play a major role in the adsorption of long alkyl chain NTA derivatives on a carbon surface. The one-step SPCE modification procedure generated dense ligand layers in only 2.5 hours offering an attractive electrode platform for the preparation of affinity biosensors by reproducible, stable, reversible and oriented immobilization of His-tagged recombinant proteins. In this work, this promising approach has been used to generate modified SPCEs surfaces rich in –COOH moieties (three –COOH groups per adsorbed molecule of HS-NTA) as scaffolds for the fabrication of integrated amperometric immunosensors towards Lp(a) by covalent immobilization of a specific capture antibody using EDC/sulfo-NHS chemistry and using a sandwich configuration (Fig. 1).

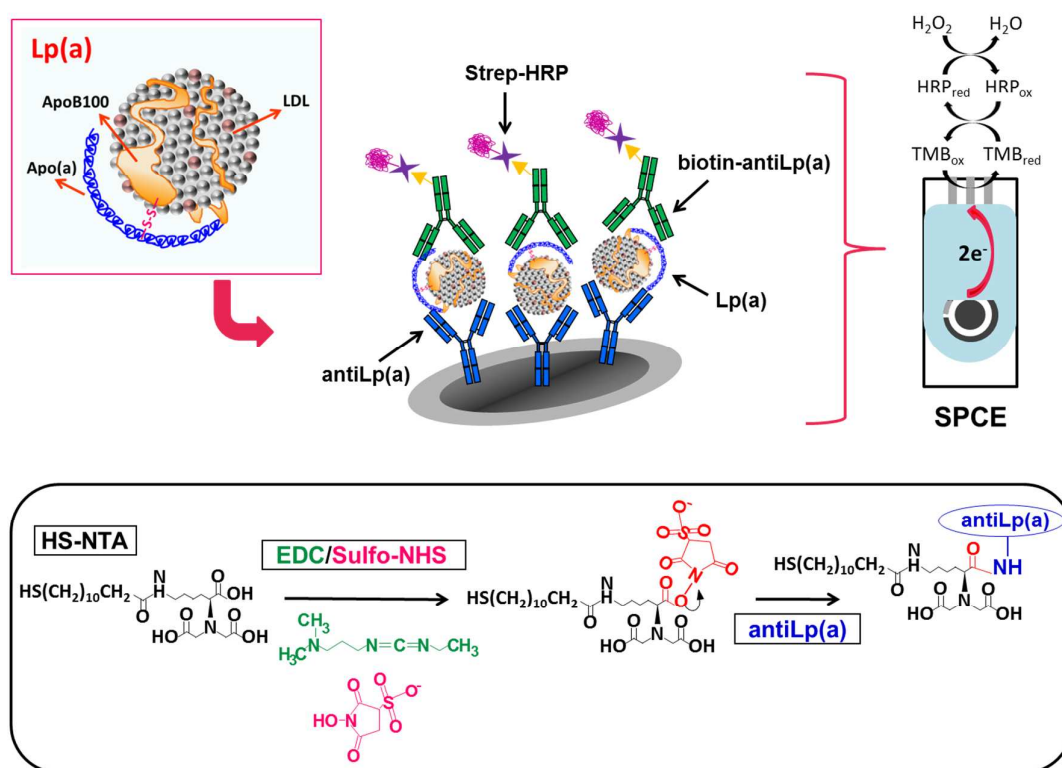


Fig. 1. Schematic display of the methodology involved in the development of a disposable Lp(a) sandwich integrated immunosensor. The electrode and enzymatic reactions involved in the amperometric detection of the mediated reduction of H₂O₂ with TMB at the SPCE are also shown. Bottom inset: details of the surface chemistry involved in the modification of the SPCEs with HS-NTA, including activation with EDC/Sulfo-NHS and covalent binding of antiLp(a). For simplification purposes only the activation of one of the three –COOH groups is shown.

3.1. Optimization of experimental variables

All the experimental variables affecting the immunosensor analytical performance were optimized. The criterion of selection was in all cases the ratio between the current values measured at –0.10 V (vs. Ag pseudo-reference electrode) in the absence (blank) and in the presence (signal) of Lp(a) in a phosphate buffer of pH 7.0 solution as working medium and

applying the protocol described in *Section 2.4*. A Lp(a) concentration of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was employed in the optimization studies since this concentration allowed a signal to be obtained which differed significantly from the blank response. The ranges tested for all the checked variables and the selected corresponding values are collected in **Table 1**.

Table 1
Optimization of the different experimental variables affecting the performance of the integrated electrochemical immunosensor for Lp(a). See text for other variables used.

Experimental variable	Tested ranges	Selected value
[HS-NTA], mM	0.5–2.0	1.5
$t_{\text{HS-NTA}}$, min	30–240	120
[antiLp(a)], $\mu\text{g mL}^{-1}$	50–500	200
$t_{\text{antiLp(a)}}$, min	30–120	60
[Skimmed milk], dilution factor	1:10–Undiluted	1:2
t_{blocking} , min	15–60	30
[biotin-antiLp(a)], $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.5–4	2
[Strep-HRP], dilution factor	1:500–1:5000	1:1000
$t_{\text{mixture solution}}$, min ^a	0–60	30
$t_{\text{mixture solution incubation}}$, min ^b	15–60	15
Number of steps	1–3	1

^aPreincubation time of the mixture solution containing Lp(a), biotin-antiLp(a) and Strep-HRP conjugate.

^bMixture solution incubation time onto the working electrode.

The effect of the number of steps used in the sandwich immunoassay was investigated with the aim of simplifying as much as possible the assay protocol. The procedures tested were: i) a single step involving antigen capture and labeling (30 min incubation of the

antiLp(a)-SPCE in a mixture solution containing Lp(a), biotin-antiLp(a) and Strep-HRP); ii) two steps involving 30 min incubation of the immunosensor with the Lp(a) solution, followed by a 30 min incubation step in the mixture solution containing biotin-antiLp(a) and Strep-HRP); iii) three steps with 30 min sequential incubations in Lp(a), biotin-antiLp(a) and Strep-HRP solutions. As it can be seen in **Fig. 2a**, interestingly, the methodology involving only one incubation step provided the highest signal-to-blank current ratio which, moreover, reduced drastically the total assay time. This behavior was attributed to a higher efficiency of the immuno and labeling reactions as a consequence of the lower steric hindrance when the antibody, target antigen and enzymatic label were free in homogenous solution. Accordingly, this simplified protocol was employed for the implementation of the immunoassay.

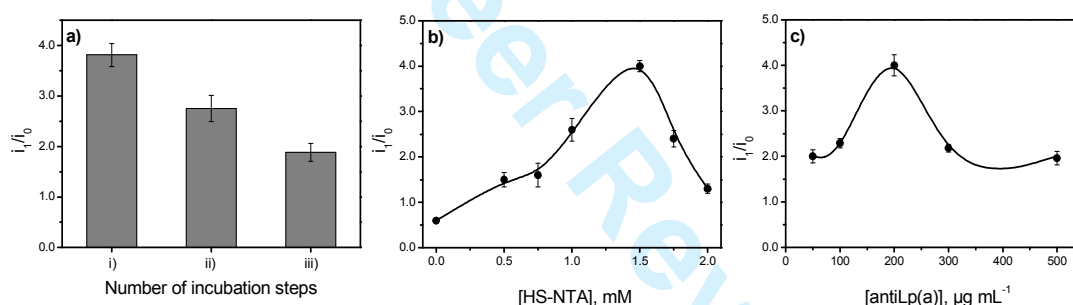


Fig. 2. Effect of the number of incubation steps used to perform the sandwich immunoassay for Lp(a) determination (a), HS-NTA concentration (b) and antiLp(a) concentration (c) on the signal-to-blank current ratio. The current ratios were measured for 1.0 (signal) and 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; $E_{\text{app}} = -0.10$ V vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: $V_{\text{inc}} = 10$ μL , [antiLp(a)] = 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, [biotin-antiLp(a)] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (a) and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b, c), $t_{\text{antiLp(a)}} = 60$ min, Strep-HRP dilution factor, 1:1000, skimmed milk dilution factor, 1:2, $t_{\text{mixture solution}} = 30$ min; $t_{\text{mixture solution incubation}} = 45$ min. Error bars estimated as triple of the standard deviation ($n=3$).

The results obtained in the optimization of the HS-NTA and antiLp(a) concentrations are shown in **Fig. 2b** and **2c**, respectively. The signal-to-blank current ratio increased with the HS-NTA concentration up to 1.5 mM and showed a dramatic decrease for larger concentrations, which can be attributed to the increase in the interfacial electron transfer resistance for high surface ligand loadings. Therefore, 1.5 mM HS-NTA was selected to modify the SPCE for further work. Furthermore, as expected, the signal-to-blank current ratio increased with the antiLp(a) loading up to 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and decreased for larger values (**Fig. 2c**) most likely due to sterically hindered binding of the antigen when high loadings of capture antibody were immobilized. Accordingly, a value of 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ antiLp(a) was selected.

It is important to highlight that no significant differences were observed in the amperometric measurements obtained in the absence or presence of 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a) when the immunosensors were prepared with SPCEs which were not modified with HS-NTA or when the HS-NTA-SPCEs were not surface-activated with EDC/Sulfo-NHS, thus demonstrating that neither the capture antibody nor the antigen were immobilized on unmodified SPCEs or unactivated HS-NTA-SPCE surfaces.

As it can be seen in **Table 1**, the concentrations of the biotin-antiLp(a) and the Strep-HRP conjugate were also optimized (see Supplementary Information, Fig. S1). The effect of the biotin-antiLp(a) concentration was studied in the 0.5–4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ range, an increase on the signal-to-blank ratio with the detector antibody concentration being observed up to 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, leveling off above this value. Regarding the Strep-HRP concentration used to label the secondary antibody, several dilution factors (comprised between 1:500 and 1:5000) were applied to the reconstituted commercial reagent (500 U mL^{-1}). The highest S/N ratio was obtained for a 1:1000 dilution factor, in agreement with the value recommended by the reagent supplier.

Considering that the protocol employed involved incubation of the immunosensor in a mixture solution containing the antigen, the biotinylated detector antibody and the electrochemical marker, the time let the reactions between these reagents in the mixture solution to proceed was optimized. As can be seen in Supplementary Information, Fig. S2a, an important increase in the signal-to blank current ratio occurred when the reaction time in the mixture solution was enlarged up to 30 min, and the ratio leveled off above this value. Moreover, the further incubation time of the antiLp(a)-SPCE in the mixture solution was checked. The largest signal-to-blank current ratios were obtained with incubation times between 15 and 30 min (Fig. S2b) showing a significant decrease for longer times probably due to protein aggregation phenomena. Therefore, times of 30 and 15 min, respectively, were selected for these immunoassay steps.

3.2. Analytical characteristics

Fig. 3 shows the calibration graph constructed for Lp(a) in PBST under the optimized experimental conditions. A linear relationship between the measured current and the logarithm of Lp(a) concentration was found over the $0.02\text{--}10\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ($2\times 10^{-3}\text{--}1\text{ mg dL}^{-1}$) range, with a slope value of $(2.49\pm 0.14)\times 10^{-8}\text{ A}$, and an intercept of $(6.16\pm 0.18)\times 10^{-8}\text{ A}$ ($r = 0.990$). The detection (LOD) and determination (LQ) limits, 0.008 and $0.02\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ (8×10^{-4} and $2\times 10^{-3}\text{ mg dL}^{-1}$) respectively, were calculated according to the $3s$ and $10s$ criteria (both expressed in concentration units), where s was the standard deviation ($n=10$) of the concentration values obtained by interpolation of the amperometric measurements with no Lp(a) in the calibration plot. The high sensitivity achieved is supported by the low K_d value calculated by ELISA for the antibody-antigen complex (0.066 nM) thus confirming the high affinity of such interaction [27]. As it was commented in the Introduction section, Lp(a) has evolved as an important independent coronary risk marker at concentrations $\geq 20\text{ mg dL}^{-1}$ and

serum Lp(a) levels $\geq 25 \text{ mg dL}^{-1}$ have been noted in 67 % of patients with rapid progression of CAD. Therefore, the achieved LOD is approximately 25,000 times lower than the minimal clinical threshold recommended to predict an increased risk of coronary heart disease which makes the immunosensor a useful and attractive tool for this purpose.

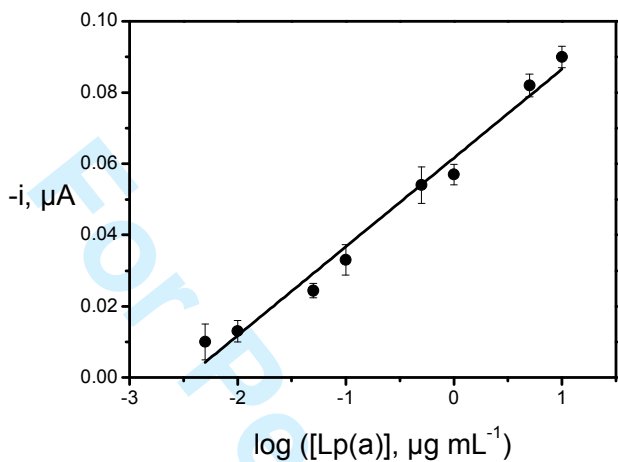


Fig. 3. Calibration curve constructed for Lp(a) in PBST, pH 7.5. Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; $E_{app} = -0.10 \text{ V}$ vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions described in Table 1 (selected values column). Error bars estimated as triple of the standard deviation ($n=3$).

Amperometric measurements for 1 μg mL^{-1} Lp(a) accomplished with 10 different immunosensors prepared on the same day yielded a relative standard deviation (RSD) value of 6.8 %, showing a good reproducibility for the immunosensor fabrication procedure and the signal transduction methodology used.

The storage stability of the integrated immunosensors was evaluated by preparing on the same day different antiLp(a)-SPCEs which were dried and stored at 4 °C . Their long-term stability was tested periodically by measuring the response for 1 μg mL^{-1} Lp(a) . A control chart was constructed by setting as the central value the mean value from 10 measurements

made the first day of the study, while the upper and lower limits of control were set at $\pm 3 \times \text{SD}$ of this initial value (**Fig. 4**). The immunosensors response remained within the control limits for 7 days indicating an acceptable storage stability of the prepared immunosensors. This storage stability is in agreement with that reported for other affinity biosensors using HS-NTA-SPCEs [26].

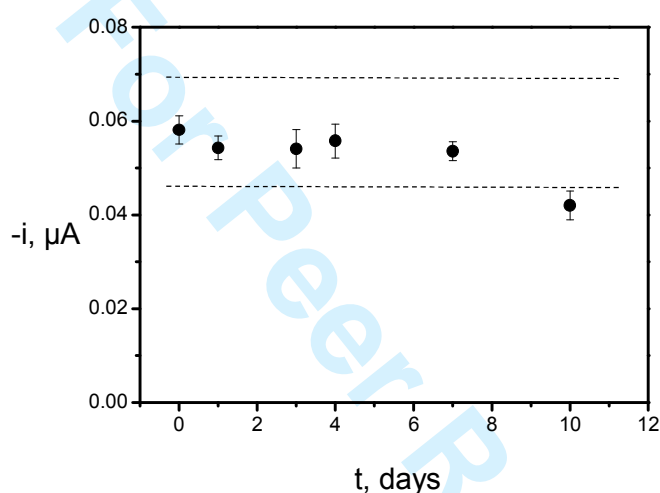


Fig. 4. Control chart constructed to check the storage stability of antiLp(a)-SPCEs stored dried at 4 °C. Results are given in the form of the steady state current values measured for 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; $E_{\text{app}} = -0.10$ V vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions as described in Table 1 (selected values column). Error bars estimated as triple of the standard deviation ($n=3$).

3.3. Selectivity of the immunosensor

To evaluate the selectivity of the immunosensor, other substances identified as cardiac biomarkers were tested at concentrations much higher than the normal values in serum: CRP (500 ng mL^{-1}), NT-proBNP (7.5 ng mL^{-1}) and cTnT (500 ng mL^{-1}). Various non-target proteins were tested also as negative controls at their concentrations commonly found in

serum or plasma (5 mg mL⁻¹ BSA, 5 mg mL⁻¹ hemoglobin, 20 µg mL⁻¹ bilirubin, 0.5 µg mL⁻¹ D-dimer, and 0.4 mg mL⁻¹ IgG). The selectivity was verified by comparing the steady state current values measured with the immunosensor for 1 µg mL⁻¹ Lp(a) in the absence and in the presence of the potential interfering compounds. As it can be seen in **Fig. 5**, the presence of all the potentially interfering compounds did not produce a significant interference in the Lp(a) determination. In this context, it is very interesting to remark that Lp(a) can be accurately determined in the presence of a huge excess of other cardiac proteins (CRP, NT-proBNP, and cTnT). This great selectivity achieved can be attributed to the use of two specific antibodies, with high affinity for the target protein, in the design of the sandwich integrated immunosensor, which drastically reduced the possibility of false negative results and improved the diagnostic certainty.

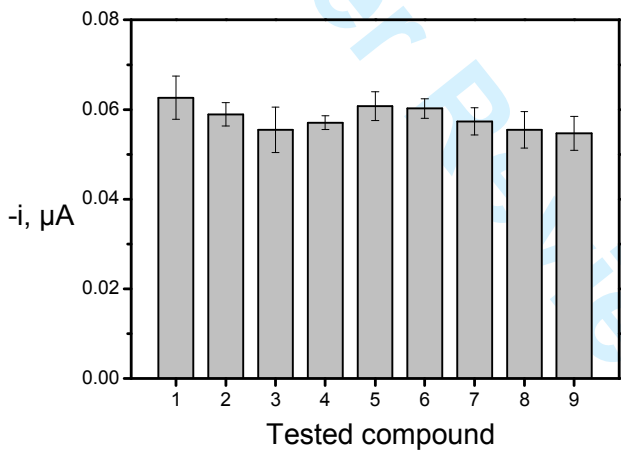


Fig. 5. Immunosensor selectivity towards Lp(a). Current values measured for 1.0 µg mL⁻¹ Lp(a) in the absence (1) or in the presence of 5 mg mL⁻¹ BSA (2), 500 ng mL⁻¹ CRP (3), 7.5 ng mL⁻¹ NT-proBNP (4), 500 ng mL⁻¹ cTnT (5), 5 mg mL⁻¹ hemoglobin (6), 20 µg mL⁻¹ bilirubin (7), 0.5 µg mL⁻¹ D-dimer (8) and 0.4 mg mL⁻¹ IgG (9). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; E_{app} = -0.10 V vs Ag pseudo-reference electrode. Other

conditions as described in Table 1 (selected values column). Error bars estimated as triple of the standard deviation ($n=3$).

3.4. Determination of Lp(a) in human serum samples

The usefulness of the developed methodology for the analysis of real clinical samples was evaluated by determining Lp(a) in spiked human serum samples and in a commercial serum containing a certified amount of Lp(a). The possible existence of a matrix effect was verified by constructing a calibration graph for Lp(a) in an appropriately spiked human serum which, before spiking, did not give any significant amperometric response with the immunosensor thus indicating that the possible content of endogenous Lp(a) was below the detection limit. The serum samples were 40-times diluted in PBST, pH 7.5. The slope value of the corresponding linear calibration plot ($r = 0.996$) was $(2.50 \pm 0.07) \times 10^{-8}$ A with an intercept value of $(6.09 \pm 0.09) \times 10^{-8}$ A. This value is not statistically different to that obtained with the standard Lp(a) solutions ($2.49 \pm 0.14 \times 10^{-8}$ A) with the $t_{\text{calc}} = 0.433$ being lower than $t_{\text{tab}} = 2.179$, thus demonstrating the inexistence of apparent matrix effect in the diluted human serum samples.

Human serum samples (free of target protein) were spiked with $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a). Thereafter, they were 40-times diluted with the PBST pH 7.5 solution. As no matrix effect was observed, the Lp(a) determination was accomplished by interpolation of the measured current values for the spiked samples into the calibration plot shown in **Fig. 3**. The results for 5 samples yielded a mean content of $(200 \pm 7) \mu\text{g mL}^{-1}$, with the confidence interval calculated for $\alpha = 0.05$. Therefore, the mean recovery of $(100 \pm 3) \%$ demonstrated fairly well the usefulness of the immunosensor for the accurate quantification of Lp(a) in serum despite the presence of high amounts of other proteins. It is important to point out that only a dilution

with the working buffer solution is required as sample treatment and that the total time for the assay is 45 min (once the antiLp(a)-SPCEs are prepared).

The validity of the immunosensor was also verified by analyzing an International Standard for Lp(a) serum containing a certified concentration of $561 \mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a) in the reconstituted sample. Once more, the possible existence of a matrix effect was tested by constructing a calibration plot from the sample diluted with PBST until a final Lp(a) concentration of $0.561 \mu\text{g mL}^{-1}$ and upon subsequent adequate spiking with growing amounts of a standard Lp(a) solution. The slope value $((2.66 \pm 0.12) \times 10^{-8} \text{ A})$ corresponding to the linear calibration plot ($r = 0.996$) was not either statistically different to that obtained with the standard Lp(a) solutions ($t_{\text{calc}} = 0.169$; $t_{\text{tab}} = 2.306$) and, therefore, it could be concluded that no significant matrix effect was apparent after the sample dilution. Accordingly, the Lp(a) quantification could be accomplished by simple interpolation of the signal from the sample into the calibration plot constructed with Lp(a) standards. The results obtained for seven replicates yielded a mean concentration for Lp(a) of $(560 \pm 9) \mu\text{g mL}^{-1}$. The statistical comparison according to the Student's t test ($t_{\text{calc}} = 0.326$; $t_{\text{tab}} = 2.447$) allowed us to conclude that no significant differences were found between the results provided by the integrated immunosensor and the certified value at a confidence level of 95 %.

It is also important to note that, so far, no Lp(a) immunosensor (electrochemical or not) has been described in literature. The currently available Lp(a) assays commented in the Introduction section, provide LODs ranging from 0.3 (turbidimetric immunoassays) to 5 mg dL^{-1} (ELISAs) which are much higher than that achieved with the developed immunosensor ($8 \times 10^{-4} \text{ mg dL}^{-1}$). Besides their lower sensitivity, ELISA kits use tedious, time-consuming multistage processes and expensive detection instrumentation.

4. Conclusions

A disposable amperometric integrated immunosensor for the rapid, specific and sensitive determination of Lp(a) in human serum has been developed for the first time. An innovative design involving modification of SPCEs with a dense monolayer of a long alkyl chain NTA ligand, through an easy and short protocol, for the covalent immobilization of the capture antibodies was developed. This immobilization together with a sandwich-type immunoassay and an enzyme amplified amperometric transduction resulted in an excellent analytical performance of the immunosensor with a LOD of 8×10^{-4} mg dL⁻¹, well below the minimum cut-off value (20 mg dL⁻¹) to predict the probability of cardiovascular risk. Moreover a reliable detection of Lp(a) across the clinical relevant range in human serum was possible after just a simple dilution of the sample. The applicability of the immunosensor was demonstrated by analyzing spiked serum samples and a commercial serum containing a certified Lp(a) content. The short analysis time required (only 45 min), the great analytical performance exhibited and the use of disposable mass-produced sensors combined with the simplicity and easy automation and miniaturization of the required instrumentation make the developed integrated immunosensor a promising, attractive and user-friendly alternative diagnosis tool for the development of POCT devices for clinical diagnosis and prognosis through on-site determination of a biomarker considered as a sensitive indicator of increased risk for major coronary events. On the other hand, it is anticipated that the simple, versatile, efficient, and fast immobilization approach developed should be useful in the development of other bioanalytical strategies of interest.

Acknowledgments

The financial support of the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad Research Projects, CTQ2012-34238, and the AVANSENS Program from the Comunidad de Madrid (S2009PPQ-1642) are gratefully acknowledged. B. Esteban-Fernández de Ávila acknowledges a FPI fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación. The authors would like to acknowledge Audit Diagnostics Company for kindly providing the Lp(a) and its specific antibodies.

Appendix. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at...

References

1. Klingenberg R, Hansson GK (2009) Treating inflammation in atherosclerotic cardiovascular disease: emerging therapies. *Eur Heart J* 30:2838–2844.
2. Ross R (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 138:S419–S420.
3. Malaguarnera M, Vacante M, Russo C, Malaguarnera G, Antic T, Malaguarnera L, Bella R, Pennisi G, Galvano F, Frigiola A (2013) Lipoprotein(a) in cardiovascular diseases. *BioMed Research International* 1–9.
4. Marcovina SM, Koschinsky ML, Albers JJ, Skarlatos S (2003) Report of the national heart, lung, and blood institute workshop on lipoprotein(a) and cardiovascular disease: Recent advances and future directions. *Clin Chem* 49:1785–1796.
5. Riches K, Porter KE (2012) Lipoprotein(a): Cellular Effects and Molecular Mechanisms. *Cholesterol*. Article ID 923289, 10 pages, doi:10.1155/2012/923289.
6. Dubé JB, Boffa MB, Hegele RA, Koschinsky ML (2012) Lipoprotein(a): more interesting than ever after 50 years. *Curr Opin Lipidol* 23:133–140.

7. Kamstrup PR, Tybjaerg-Hansen A, Steffensen R, Nordestgaard BG (2009) Genetically elevated lipoprotein(a) and increased risk of myocardial Infarction. *JAMA* 301:2331–2339.
8. Erqou S, Kaptoge S, Perry PL, Di AE, Thompson A, White IR, Marcovina SM, Collins R, Thompson SG, Danesh J (2009) Lipoprotein(a) concentration and the risk of coronary heart disease, stroke, and nonvascular mortality. *JAMA* 302:412–423.
9. Etingin OR, Hajjar DP, Hajjar KA, Harpel PC, Nachman RL (1991) Lipoprotein(a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells: A potential mechanism in thrombogenesis. *J Biol Chem* 266: 2459–2465.
10. Tsimikas S, Hall JL (2012) Lipoprotein(a) as a Potential Causal Genetic Risk Factor of Cardiovascular Disease. *J Am Coll Cardiol* 60:716–721.
11. Kostner KM, Oberbauer R, Hoffmann U, Stefenelli T, Maurer G, Watschinger B (1997) Urinary excretion of apo(a) in patients after kidney transplantation. *Nephrol Dial Transpl* 12:2673–2678.
12. Suk DJ, Rifai N, Buring JE, Ridker PM (2006) Lipoprotein(a), measured with an assay independent of apolipoprotein(a) isoform size, and risk of future cardiovascular events among initially healthy women. *JAMA* 296:1363–1370.
13. Gazzaruso C, Garzaniti A, Giordanetti S, Falcone C, Fratino P (2002) Silent coronary artery disease in type 2 diabetes mellitus: the role of Lipoprotein(a), homocysteine and apo(a) polymorphism. *Cardiovasc Diabetol* 1:5.
14. Fan J, Sun H, Unoki H, Shiomi M, Watanabe T (2001) Enhanced atherosclerosis in Lp(a) WHHL transgenic rabbits. *Ann N Y Acad Sci* 947:362–365.
15. Imhof A, Rothenbacher D, Khuseyinova N (2003) Plasma lipoprotein Lp(a) and risk of coronary heart disease: what are the mechanisms involved? *European Journal of Cardiovascular Prevention & Rehabilitation* 10:362–370.

16. Motta M, Giugno I, Bosco S (2001) Serum lipoprotein(a) changes in acute myocardial infarction. *Panminerva Med* 43:77–80.
17. Nordestgaard BG, Chapman MJ, Ray K, Borén J, Andreotti F, Watts GF, Ginsberg H, Amarencu P, Catapano A, Descamps OS, Fisher E, Kovanen PT, Kuivenhoven JA, Lesnik P, Masana L, Reiner Z, Taskinen M-R, Tokgözoğlu L, Tybjaerg-Hansen A, (2010) Lipoprotein(a) as a cardiovascular risk factor: current status. *Eur Heart J* 28:44–2853.
18. Torres MB, Álvarez FH, Rodríguez Hernández A, Sorell-Gómez L, Cabalé MB (1998) Evaluación de un método rápido para la detección de niveles elevados de Lipoproteína (a): Aubiodot Lp (a). *Rev Cubana Cardiol Cir Cardiovasc* 24:29–35.
19. Wang J, Zhang C, Gong J, Zhu Y, Fu L, Wang X, Li K (2007) Development of new enzyme-linked immunosorbent assay for oxidized lipoprotein(a) by using purified human oxidized lipoprotein(a) autoantibodies as capture antibody. *Clin Chim Acta* 385:73–78.
20. Gómez M, Valle V, Arós F, Sanz G, Sala J, Fiol M, Bruguera J, Elosua R, Molina L, Martí H, Covas MI, Rodríguez-Llorián A, Fitó M, Suárez-Pinilla MA, Amezcua R, Marrugat J (2009) Oxidized LDL, lipoprotein (a) and other emergent risk factors in acute myocardial infarction (FORTIAM study). *Rev Esp Cardiol* 62:373–382.
21. Hayat A, Barthelmebs L, Sassolas A, Marty J-L (2011) An electrochemical immunosensor based on covalent immobilization of okadaic acid onto screen printed carbon electrode via diazotization-coupling reaction. *Talanta* 85:513–518.
22. Huy TQ, Hanh NTH, Chung PV, Anh DD, Nga PT, Tuan MA (2011) Characterization of immobilization methods of antiviral antibodies in serum for electrochemical biosensors. *Appl Surf Sci* 257:7090–7095.
23. Vallina-García R, García-Suárez MM, Fernández-Abedul MT, Méndez FJ, Costa-García A (2007) Oriented immobilisation of anti-pneumolysin Fab through a histidine tag for electrochemical immunosensors. *Biosens Bioelectron* 23:210–217.

- 1
2
3 24. Valiokas R, Klenkar G, Tinazli A, Reichel A, Tampe' R, Piehler J, Liedberg B (2008)
4
5 Self-assembled monolayers containing terminal mono-, bis-, and tris-nitrilotriacetic acid
6
7 groups: □ characterization and application. *Langmuir* 24:4959–4967.
8
9
10 25. Esteban-Fernández de Ávila B, Escamilla-Gómez V, Campuzano S, Pedrero M,
11
12 Pingarrón JM (2013) Disposable electrochemical magnetoimmunosensor for the
13
14 determination of troponin T cardiac marker. *Electroanal* 25:51–58.
15
16 26. Conzuelo F, Gamella M, Campuzano S, Martínez-Ruiz P, Esteban-Torres M, de las Rivas
17
18 B, Reviejo AJ, Muñoz R, Pingarrón JM (2013) Integrated amperometric affinity
19
20 biosensors using Co^{2+} -tetradentate nitrilotriacetic acid modified disposable carbon
21
22 electrodes: application to the determination of β -lactam antibiotics. *Anal Chem* 85:3246–
23
24 3254.
25
26
27 27. Huang Y, Bell MC, Suni II (2008) Impedance biosensor for peanut protein Ara h 1. *Anal*
28
29 *Chem* 80:9157–9161.
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

LIPOPROTEIN(A) DETERMINATION IN HUMAN SERUM USING A
NITRILOTRIACETIC ACID DERIVATIVE IMMUNOSENSING SCAFFOLD
ON DISPOSABLE ELECTRODES

Berta Esteban-Fernández de Ávila, Susana Campuzano*, María Pedrero, J.-Pablo
Salvador, M.-Pilar Marco and José M. Pingarrón*

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Optimization of experimental variables

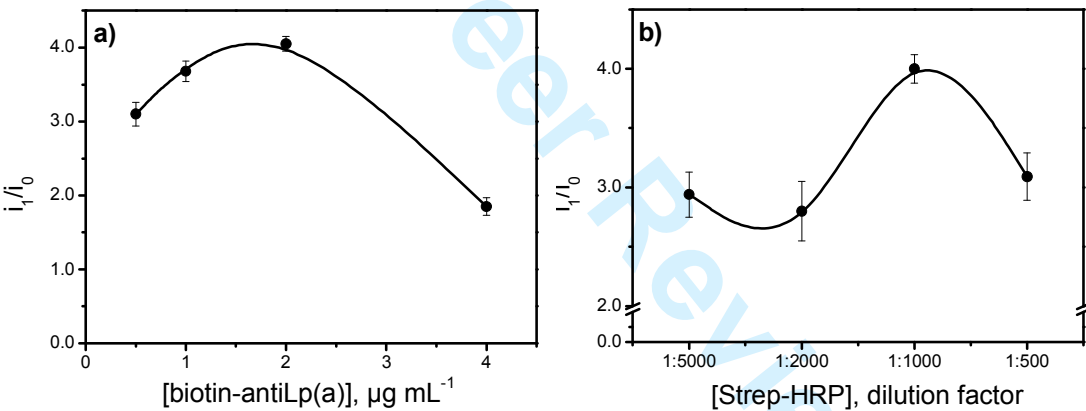


Fig. S1. Effect of the biotinylated detector antibody concentration (a) and the Strep-HRP marker dilution factor (b) on the signal-to-blank current ratio measured for 1.0 and 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; $E_{\text{app}} = -0.10$ V vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: $V_{\text{inc}} = 10$ μL , [HS-NTA] = 1.5 mM, $t_{\text{HS-NTA}} = 120$ min; [antiLp(a)] = 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ; $t_{\text{antiLp(a)}} = 60$ min, [biotin-antiLp(a)] = 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (b), Strep-HRP dilution factor = 1:1000 (a), skimmed milk dilution factor = 1:2, $t_{\text{mixture solution}} = 30$ min, $t_{\text{mixture solution incubation}} = 45$ min. Error bars estimated as triple of the standard deviation (n=3).

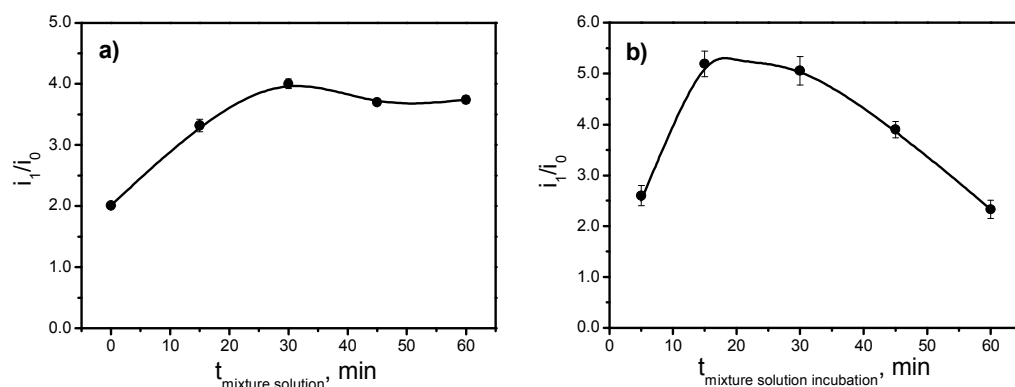
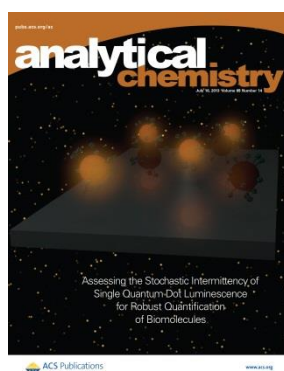


Fig. S2. Effect of the reaction time between the antigen, the biotinylated detector antibody and the Strep-HRP marker in the mixture solution (a) and the incubation time of the modified electrode in the mixture solution (b) on the signal-to-blank current ratio measured for 1.0 and 0.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ Lp(a). Supporting electrolyte, 0.1 M sodium phosphate solution, pH 7.0; $E_{\text{app}} = -0.10 \text{ V}$ vs Ag pseudo-reference electrode. Other conditions: $V_{\text{inc}} = 10 \mu\text{L}$, $[\text{HS-NTA}] = 1.5 \text{ mM}$, $t_{\text{HS-NTA}} = 120 \text{ min}$, $[\text{antiLp(a)}] = 200 \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_{\text{antiLp(a)}} = 60 \text{ min}$, $[\text{biotin-antiLp(a)}] = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, Strep-HRP dilution factor = 1:1000, skimmed milk dilution factor = 1:2, $t_{\text{mixture solution}} = 30 \text{ min}$ (b), $t_{\text{mixture solution incubation}} = 45 \text{ min}$. Error bars estimated as triple of the standard deviation ($n=3$).

Determinants of the detection limit and specificity of surface-based biosensor

Esteban-Fernández de Ávila, B.; Watkins, H.; Pingarrón, J. M.;
Plaxco, K.; Palleschi, G.; Ricci, F.



Vol. 85 p. 6593–6597, 2013

Determinants of the Detection Limit and Specificity of Surface-Based Biosensors

Berta Esteban Fernández de Ávila,[†] Herschel M. Watkins,[‡] José M. Pingarrón,[†] Kevin W. Plaxco,^{‡,§,⊥} Giuseppe Palleschi,^{¶,||} and Francesco Ricci^{*,¶,||}

[†]Departamento de Química Analítica, Facultad de CC. Químicas Universidad Complutense de Madrid, E-28040 Madrid, Spain

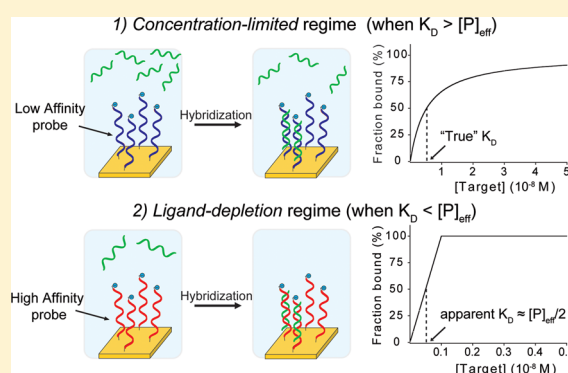
[‡]Department of Chemistry and Biochemistry, [§]Center for Bioengineering, and [⊥]Interdepartmental Program in Biomolecular Science and Engineering, University of California, Santa Barbara, California 93106, United States

[¶]Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche, University of Rome, Tor Vergata, Via della Ricerca Scientifica, 00133, Rome, Italy

^{||}Consorzio Interuniversitario Biostrutture e Biosistemi "INBB", Rome, Italy

S Supporting Information

ABSTRACT: Here, we employ a model electrochemical DNA sensor to demonstrate that the detection limit and specificity of surface-based sensors often are not dependent on the true affinity of the probe for its target but are simply dependent on the effective probe concentration. Under these circumstances, the observed affinity (and thus the sensor's detection limit and specificity) will depend on the density with which the probes are packed on the surface of the sensor, the surface area, and even the volume of sample employed.



Due to their potential applications in, for example, point-of-care diagnostics, reagentless sensors that employ surface-bound biomolecules as their recognition elements have garnered significant recent attention.^{1–4} Despite their increasingly widespread study, however, it appears that key aspects of the performance of these sensors are still widely misunderstood. Specifically, studies of the detection limits (the detection threshold) and specificity (the discrimination threshold) of sensors in this class often yield highly divergent answers. A clear example of this is provided by the voluminous literature on hybridization-based sensors for the detection of specific oligonucleotide sequences.⁵ Although many authors have demonstrated robust discrimination between DNA sequences differing by as little as a single nucleotide, others have found that such surface-based sensors fail to achieve such high levels of specificity.^{5–8} Equally alarmingly, other studies have reported detection limits differing by up to 3 orders of magnitude despite employing recognition elements expected to exhibit comparable dissociation constants.^{5–8}

We believe that many of the above-described discrepancies arise due to the fact that surface-based biosensors can operate in either of two regimes, each of which produces different behavior. Specifically, the observed affinity (which, along with the sensor's gain and noise floor, defines its detection limit) of surface-based biosensors is ultimately defined by either the *concentration* or the *absolute number* of target molecules necessary to occupy a threshold fraction of the recognition

probes on the sensor surface. Which of these two regimes a sensor is operating in, however, depends on the specifics of the true affinity of the probe, the density with which it is packed onto the sensor's surface, and even the sample volume under interrogation.

In a regime in which the number of target molecules participating in probe/target complexes is low relative to the total number of target molecules in the sample, occupancy is defined by the concentration of the target relative to the affinity (K_D) with which it binds the probe (Figure 1, top). Under these *concentration-limited* conditions, binding is generally well described using a simplified hyperbolic Langmuir isotherm⁹ with a midpoint value reflecting dissociation constant (K_D) of the probe/target complex:

$$S([T]) = S_0 + (S_B - S_0) \frac{[T]}{[T] + K_D} \quad (1)$$

where $S([T])$ is the measured output signal at target concentration $[T]$, S_0 is the background signal observed in the absence of target, and S_B is the signal observed at saturating target concentrations. These *concentration-limited* conditions are typically met (and eq 1 obeyed) when the sample volume is

Received: April 25, 2013

Accepted: May 29, 2013

Published: May 29, 2013

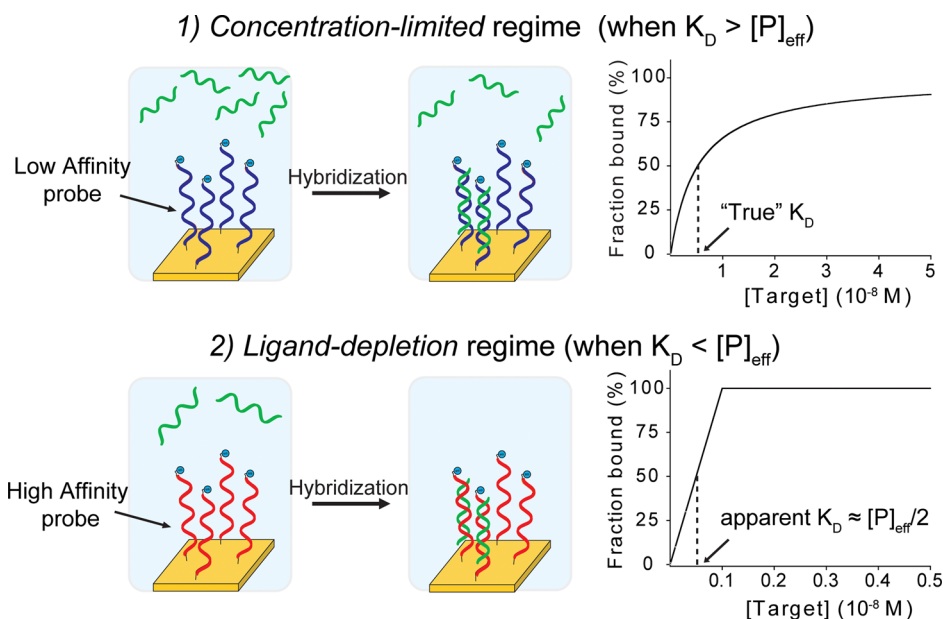


Figure 1. Surface-based sensors can operate in two regimes. (Top) The first, the *concentration-limited* regime, occurs when the effective probe concentration, $[P]_{\text{eff}}$ (i.e., the concentration that would be seen if the probe were released from the surface and dispersed through the sample volume), is lower than the true affinity of the probe for its target (K_D). Under these conditions, occupancy is defined by the molar concentration of the target (relative to K_D) and a classic Langmuir-isotherm is observed for which the midpoint reflects the true K_D of the probe/target complex. (Bottom) Conversely, if the true affinity of the probe for its target is very high (i.e., the true K_D is low and is lower than the effective probe concentration), significant occupancy is observed even at very low target concentrations, concentrations low enough that the number of target molecules bound to the probe can be of similar magnitude to the total number in the sample. Under these *ligand-depletion* conditions, occupancy is no longer defined by the true affinity of the probe or the concentration of the target in solution but instead by the total number of ligand (target) molecules in the sample relative to the total number of probes on the sensor surface. In this latter case, a bilinear binding curve is observed with a midpoint at a target concentration half of the effective probe concentration ($[P]_{\text{eff}}/2$). In this work, we perform an exhaustive, quantitative study of the key determinants (e.g., surface probe density, sample volume, and true K_D) that define these two regimes, using as our test-bed an electrochemical DNA sensor.²

high (and thus the ratio of target molecules to probe molecules is high) and the affinity of the probe for its target is poor (thus requiring relatively high target concentrations in order to achieve detectable occupancy).

In contrast to the *concentration-limited* regime, quite different behavior occurs under conditions in which probe occupancy is limited instead by the absolute number of target molecules in the sample. Specifically, if the probe binds its target very avidly (i.e., K_D is very low), each additional molecule of target in a sample will bind to a probe until all of the probes are saturated (Figure 1, bottom). Under these conditions, the relationship between occupancy and target concentration is bilinear,^{10–13}

$$S([T]) = S_0 + (S_B - S_0) \frac{[T]}{[P]_{\text{eff}}} \quad (2)$$

where $[P]_{\text{eff}}$, the effective probe concentration, is the concentration of probe were it liberated from the surface and dispersed throughout the sample volume. Under these *ligand-depletion* conditions, occupancy is no longer defined by the true affinity of the probe or the concentration of the target in solution but instead by the total number of target molecules in solution (which depends, in turn, on both the sample volume and the target concentration) relative to the number of probe molecules (which is dependent on probe packing density and the surface area of the sensor). When this occurs, the midpoint of a concentration/output plot (the “apparent” affinity, $K_{D,\text{app}}$) does not reflect the true affinity of the probe for its target (K_D) but is instead given by $[P]_{\text{eff}}/2$.

There thus exist two regimes. If the probe’s K_D is greater than $[P]_{\text{eff}}$ the sensor is in the *concentration-limited* regime, and the observed K_D reflects the true affinity of the probe for its target (Figure 1, top). If, in contrast, the probe’s K_D is less than $[P]_{\text{eff}}$ the sensor is in the *ligand-depletion* regime and the observed K_D does not reflect the “true” K_D . Under this condition, the observed K_D will instead depend on the experimental conditions including probe density, surface area, and sample volume (Figure 1, bottom). In principle, the shape of a binding curve should discriminate between the *concentration-limited* regime (when the midpoint reflects the true affinity) and the *ligand-depletion* regime (where it does not). In practice, however, discriminating between a bilinear curve and a hyperbolic curve can prove difficult (Figure 2), leading to the discrepancies discussed above regarding the observed affinities and specificities of surface-based sensors. Here, we explore this important issue quantitatively, demonstrating the ease with which the two regimes can be confused and describing several quantitative tests to distinguish between them.

MATERIALS AND METHODS

A 27-base 5′ thiol-, 3′ methylene blue (MB)-modified probe DNA was obtained from Biosearch and employed as the signaling probe DNA. Target DNA sequences (perfect match and 1-base mismatch) were obtained from Sigma-Aldrich (see Supporting Information for sequences). E-DNA sensors were fabricated on gold screen printed-electrodes¹⁴ as previously described² (see Supporting Information for details). We note

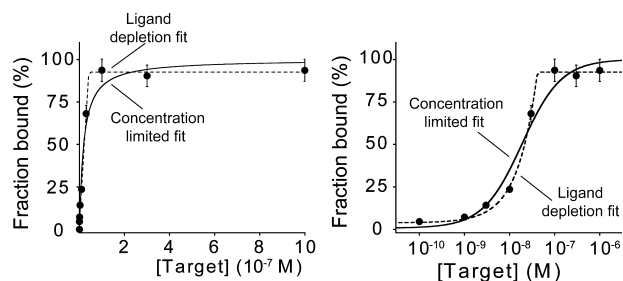


Figure 2. In practice, differentiating between the *concentration-limited* and *ligand-depletion* regimes with simple binding curve experiments is often quite difficult, leading to significant discrepancies in the interpretation of results derived using surface-based sensors. Here, we expand on this theme by exploring the key determinants of the switch between these two regimes and demonstrating several tests that help discriminate between them. Shown are actual experimental data obtained using the E-DNA electrochemical biosensor² described below and fit with both *ligand-depletion* and *concentration-limited* equations using a linear (left) and the more commonly used logarithmic (right) scale. For a matter of clarity in these binding curves and in those in the following figures, error bars have been depicted for only some points on each curve and represent the average and standard deviations of measurements performed on at least three independent sensors.

that the use of gold screen printed-electrodes with E-DNA sensors was recently described achieving similar results than those obtained with classic rod gold electrodes.^{2b} All experiments were performed in 150 mM NaCl/50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. Binding curves were obtained by interrogating with square wave voltammetry (see Supporting Information for details) each sensor in buffer solution (background signal) and at different target concentrations until signal suppression was stable. The signal changes have been normalized on a 0–100 scale to allow for more ready interpretation of the results. Probe surface-density was determined using a previously established method¹⁵ based on the use of RuHex (see Supporting Information for details).

RESULTS AND DISCUSSION

As a test bed to explore the *concentration-limited* and *ligand-depletion* regimes, we have employed an electrochemical-DNA (E-DNA) sensor as our model system.² Specifically, we have employed an E-DNA sensor composed of a 27-base linear DNA probe covalently modified on the 3' terminus with a redox reporter (methylene blue, MB) and on the 5' terminus with a long-chain alkane thiol, which enables chemi-absorption to the gold electrode surface via a gold–thiol bond. In the absence of a complementary target, the probe's structure allows the redox reporter to move into proximity with the electrode, supporting efficient electron transfer.² Upon hybridization to its target, the linear probe assumes a relatively rigid, double-stranded conformation that reduces the efficiency with which the reporter approaches the surface, reducing electron transfer rates, and decreasing the Faradic current observed when the sensor is interrogated using square wave voltammetry.²

The true affinity of our linear DNA probes is very high: the K_D for a fully complementary 27-base target–probe duplex is estimated to be subfemtomolar (calculated using the *m-fold* algorithm¹⁶). Our model sensor thus operates under *ligand-depletion* conditions for any reasonable set of sample volume, probe density, and sensor surface area values. The experimental results obtained by challenging the sensor with increasing concentrations of its target nevertheless fit both the bilinear and

Langmuir-isotherm curves with effectively identical precision (Figure 2), highlighting the sometimes difficult nature of distinguishing between the two types of behavior.

To demonstrate how working under *ligand-depletion* regime can lead to misinterpretation of observed affinity, we have fabricated a set of matching E-DNA sensors varying only in probe density and, thus, when deployed against a fixed sample volume, varying in effective probe concentration. Challenging these with the same 27-base, perfectly matched target produces binding curves with midpoint values ranging from 3.1 ± 0.1 nM at the lowest probe density to 16.3 ± 0.2 nM at the highest (Figure 3, left). This probe-density dependence, which occurs

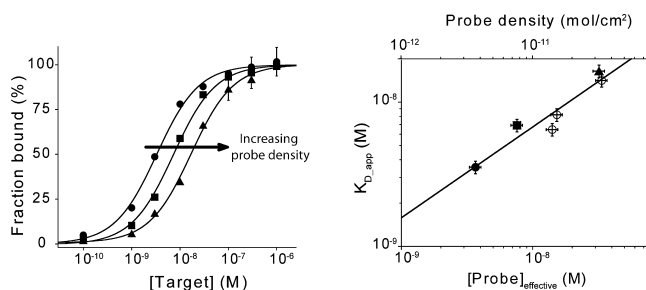


Figure 3. In the *ligand-depletion* regime, the apparent affinity of a sensor varies with increasing probe density. (left) Shown are binding curves obtained from sensors differing in probe density (left to the right: 0.37 , 0.76 , and 3.2×10^{-11} mol/cm²). With a surface area of 0.07 cm² and in a sample volume of 70 μ L, these values correspond to effective probe concentrations of 3.7 to 32.6×10^{-9} M. (right) Under these (fixed sample volume) experimental conditions, the apparent affinities of the sensors are well correlated with their probe densities.

despite the fact that, to a first approximation, the true affinity of the probe for its target should be independent of probe density, is a clear signal of the *ligand-depletion* regime. That is, here the true affinity of the probe for its target is much lower than the effective concentration of probe molecules in the sample, and thus, every target molecule in the sample binds to a probe until the limit in which all probes are bound. Given this, the increase in effective probe concentration associated with increasing probe-density leads, in turn, to an increase in the apparent affinity. Consistent with this, $K_{D,app}$ is proportional to probe density under this set of experimental conditions (i.e., fixed sample volume) (Figure 3, right).

The effective probe concentration and, thus, the apparent affinity observed in the *ligand-depletion* regime also depends on sample volume.¹¹ To demonstrate this, we have challenged identical sensors (i.e., all of the same probe density and surface area) against a range of sample volumes (Figure 4). As expected, the $K_{D,app}$ observed for the smallest sample volume is about 2 orders of magnitude higher than that of the largest.

An important consideration is that, as long as we remain in the *ligand-depletion* regime, the apparent affinity is independent of the true affinity. To demonstrate this, we have measured the apparent affinity of a sensor against a set of targets differing in true affinity. We did so by using perfectly matched targets of different length ranging from 27 (higher true affinity) to 13-bases (lower true affinity). Of note, all these targets have estimated subnanomolar true affinities. While there was a clear trend in total signal suppression (Figure 5, left), with longer targets creating greater signal changes (due to the increased rigidity of the longer double-stranded probe–target duplexes^{2b,c}), the apparent affinity (3.6 ± 0.3 nM) is, to within

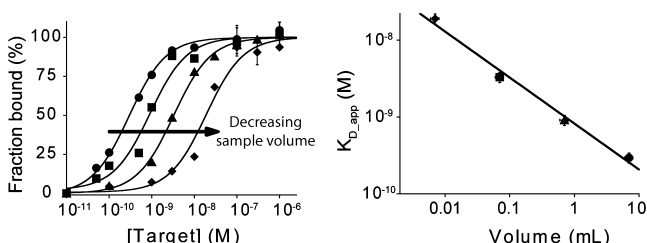


Figure 4. Under *ligand-depletion* regime, apparent affinity depends strongly on sample volume because this changes the effective probe concentration in solution. Here, we used a 27-base target with an estimated femtomolar true affinity that assures the sensor is under *ligand-depletion* regime at all the volumes tested. Accordingly, upon decreasing the sample volume (thus increasing the effective probe concentration), we observe a consistent increase in the observed K_{D_app} of the sensor.

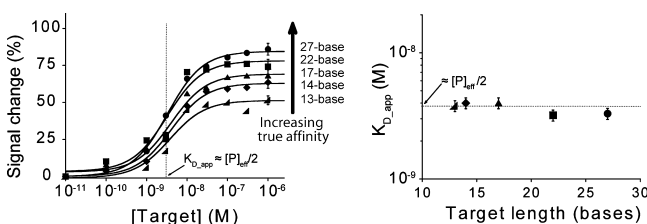


Figure 5. Under *ligand-depletion* regime, the apparent affinity is independent of the true affinity. To demonstrate this, we have challenged identical sensors with targets varying in length and thus of varying true affinity. Of note, the true affinities of all these different targets are all in the subnanomolar range, and thus, they all operate under *ligand-depletion* regime in this experimental condition. While longer targets produce greater ultimate signal change (due to their larger effects on probe dynamics^{2b,c}) (left), the apparent affinity remains constant (right).

experimental error, independent of target length (Figure 5, right). Again, this is because the apparent affinity observed in this regime is defined by the effective probe concentration, which does not vary with target length or affinity.

The inability to differentiate between targets differing in true affinity suggests a reason for the often poor specificity reported for surface-based biosensors. If the true affinity for both a perfectly matched and single-base mismatched target are *both* below the minimum apparent affinity that can be measured, then both targets will produce *the same apparent affinity*. To demonstrate this, we have measured the apparent affinity of our sensor for mismatched targets of various lengths and compared these values to the affinities measured for the perfectly matched target of the same length. For example, using long (i.e., high true affinity), 27-base targets, the apparent affinity for the perfectly matched target, 2.7 ± 0.3 nM, is nearly indistinguishable from the 3.4 ± 0.2 nM observed for the mismatched target (Figure 6, left). Indeed, despite their poorer true affinity, this difficulty holds even for much shorter targets (e.g., 17-base target; Figure 6, center). Only for the very shortest targets (13-base) do we observe a clear difference between perfectly matched ($K_{D_app} = 3.8 \pm 0.4$ nM) and single-base mismatched (71.2 ± 0.6 nM) targets; only when the true affinity of the mismatched target becomes extremely poor do we break out of the *ligand depletion* regime (Figure 6, right). The *ligand-depletion* regime should thus be avoided if optimal discrimination efficiency is required.

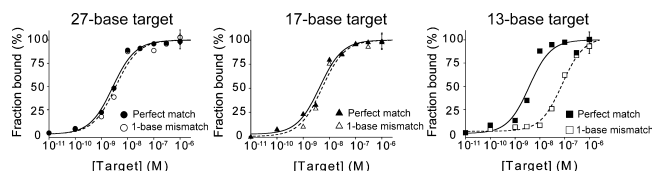


Figure 6. Good discrimination efficiency is only observed when we break out of the *ligand-depletion* regime (i.e., when the true K_D for the mismatch is greater than the effective probe concentration). Shown are binding curves for perfectly matched and 1-base mismatched targets of different lengths. While the apparent affinity for the three perfectly matched targets is the same (all are in the *ligand-depletion* regime), we only observe significant discrimination with the shortest mismatched target (right), the affinity for which is poor enough that is in the *concentration-limited* regime.

CONCLUSIONS

Here, we have shown that the observed affinity of reagentless surface-based biosensors is often defined, not by the true affinity of its probe, but instead by the effective probe concentration. Under these circumstances, the observed affinity (and thus the sensor's detection limit and specificity) will depend on the density with which the probes are packed on the surface of the sensor, the surface area, and even the volume of sample employed. Under this *ligand-depletion* regime, the minimum observable affinity (and so the detection limit) thus depends on the experimental setup more than on the actual true affinity of the probe itself. Any attempt to improve detection limits without changing the experimental conditions faces significant inherent challenges. Being in the *ligand-depletion* regime also diminishes a sensor's specificity. Indeed, optimal specificity is only achieved in the *concentration-limited* regime, and thus, to achieve good specificity, experimental conditions must be tuned to push the sensor into this regime. Failure to do this may account for some previously unexplained discrepancies in the ability of surface-based DNA biosensors to discriminate between perfectly matched and mismatched targets.^{5–8} More generally, we advise our readers to pay careful attention to the conditions under which the binding curves of surface-based biosensors are derived, particularly when working with high affinity recognition elements.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in the text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: francesco.ricci@uniroma2.it.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Italian Ministry of University and Research (MIUR) through the project FIRB "Futuro in Ricerca" the Marie Curie International Outgoing Fellowship within the seventh European Community Framework Programme (PIOFGA-2011-298491 to F.R.). B.E.F.A. has a FPI fellowship from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación, and H.M.W. is a Whitaker Fellow.

■ REFERENCES

- (1) (a) Cui, Y.; Wei, Q.; Park, H.; Lieber, C. M. *Science* **2001**, 293, 1289. (b) Janshoff, A.; Galla, H.; Steinem, C. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2000**, 39, 4004. (c) Homola, J. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 377, 528. (d) Wang, J. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, 21, 1887.
- (2) (a) Lubin, A. A.; Plaxco, K. W. *Acc. Chem. Res.* **2010**, 43, 496. (b) Kang, D.; Vallee-Belisle, A.; Porchetta, A.; Plaxco, K. W.; Ricci, F. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, 51, 6717. (c) Ricci, F.; Lai, R. Y.; Plaxco, K. W. *Chem. Commun.* **2007**, 36, 3768.
- (3) (a) Vollmer, F.; Arnold, S. *Nat. Methods* **2008**, 5, 591. (b) Maehashi, K.; Katsura, T.; Kerman, K.; Takamura, Y.; Matsumoto, K.; Tamiya, E. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 782. (c) Gooding, J. J. *Electroanalysis* **2002**, 14, 1149. (d) Daniels, J. S.; Pourmand, N. *Electroanalysis* **2007**, 19, 1239.
- (4) Rant, U.; Arinaga, K.; Scherer, S.; Pringsheim, E.; Fujita, S.; Yokoyama, N.; Tornow, M.; Abstreiter, G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2007**, 104, 17364.
- (5) (a) Paleček, E.; Bartošík, M. *Chem. Rev.* **2012**, 112, 3427. (b) Wang, J. *Anal. Chim. Acta* **2001**, 469, 63. (c) Drummond, T. G.; Hill, M. G.; Barton, J. K. *Nat. Biotechnol.* **2003**, 21, 1192.
- (6) (a) Fritz, J.; Cooper, E. B.; Gaudet, S.; Sorger, P. K.; Manalis, S. R. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2002**, 99, 14142. (b) Taton, T. A.; Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L. *Science* **2000**, 289, 1757. (c) Nelson, B. P.; Grimsrud, T. E.; Liles, M. R.; Goodman, R. M.; Corn, R. M. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 1.
- (7) (a) Peterson, A. W.; Heaton, R. J.; Georgiadis, R. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, 122, 7837. (b) Peterson, A. W.; Wolf, L. K.; Georgiadis, R. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 14601. (c) Maruyama, Y.; Terao, S.; Sawada, K. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 24, 3108. (d) Zhang, J.; Chen, J. H.; Chen, R. C.; Chen, G. N.; Fu, F. F. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, 25, 815.
- (8) (a) Gasparac, R.; Taft, B. T.; Lopicre-Devlin, M. A.; Lazareck, A. D.; Xu, J. M.; Kelley, S. O. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12270. (b) Kafka, J.; Pänke, O.; Abendroth, B.; Lisdat, F. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 7467. (c) Yang, W.; Lai, R. Y. *Electrochem. Commun.* **2011**, 13, 989.
- (9) Van De Weert, M.; Stella, L. *J. Mol. Struct.* **2011**, 998, 145.
- (10) Hulme, E. C.; Trevethick, M. A. *Br. J. Pharmacol.* **2010**, 161, 1219.
- (11) Carter, C. M. S.; Leighton-Davies, J. R.; Charlton, S. J. *J. Biomol. Screening* **2007**, 12, 255.
- (12) Goldstein, A.; Barrett, R. W. *Mol. Pharmacol.* **1987**, 31, 603.
- (13) Wells, J. W.; Birdsall, N. J.; Burgen, A. S.; Hulme, E. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1980**, 632, 464.
- (14) Ricci, F.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. *Biosens. Bioelectron.* **2007**, 22, 854.
- (15) (a) Steel, A. B.; Herne, T. M.; Tarlov, M. J. *Anal. Chem.* **1998**, 70, 4670. (b) Lao, R.; Song, S.; Wu, H.; Wang, L.; Zhang, Z.; He, L.; Fan, C. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6475.
- (16) Markham, N. R.; Zuker, M. *Nucleic Acids Res.* **2005**, 33, 577.

Supporting Information for:

Determinants of the Detection Limit and Specificity of Surface-Based Biosensors

Berta Esteban Fernández de Ávila¹, Herschel M. Watkins², José M. Pingarrón¹, Kevin W. Plaxco^{2,3,4}, Giuseppe Palleschi^{5,6}, Francesco Ricci^{5,6,}*

Reagents and DNA probes

Reagent grade chemicals, including sodium chloride (NaCl), trizma hydrochloride ($C_4H_{11}NO_3 \cdot HCl$), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 6-mercapto-1hexanol (C_6-OH), tris-(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP), hexaammineruthenium (III) chloride ($Ru(NH_3)_6Cl_3$) (all from Sigma-Aldrich), sodium phosphate monobasic ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$) and sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4) (all from Carlo Erba Reagenti) were used without further purification. A 27-base 5' thiol-, 3' methylene blue (MB)-modified probe DNA (5'-d Thiol C6 SS-CGT CAA TCT TCT ATT TCT CCA CAC TGC T-methylene blue-3') was obtained from Biosearch (Novato, CA), and employed as the probe DNA.

Target DNA sequences

We employed the following target DNA sequences of varying lengths and structures, all of which were obtained via commercial synthesis (Sigma-Aldrich). The target sequences were as follows:

T-27 (27-base target, 5'-GCA GTG TGG AGA AAT AGA AGA TTG ACG-3'); **MM-27** (27-base mismatch target, 27 bases, 5'-GCA GTG TGG ACA AAT AGA AGA TTG ACG-3'); **T-22** (22-base target, 5'-GGA GTG TGG AGA AAT AGA AGA T-3'); **MM-22** (22-base mismatch target, 5'-GCA GTG TGG AGA AAT AGA AGA T-3'); **T-17** (17-base target, 5'-GTG GAG AAA TAG AAG AT-3'); **MM-17** (17-base mismatch target, 5'-GTG GAC AAA TAG AAG AT-3'); **T-14** (14-base target, 5'-TGG AGA AAT AGA AG-3'); **MM-14** (14-base mismatch target, 5'-TGG ACA AAT AGA AG-3'); **T-13** (13-base target, 5'-GGA GAA ATA GAA G-3') and **MM-13** (13-base mismatch target, 5'-GGA CAA ATA GAA G-3').

In the above sequences underlined bases identify the mismatched bases.

Sensor Fabrication

E-DNA sensors were manufactured on 3 mm diameter gold screen printed-electrodes¹⁴, fabricated as previously described² and used without any pretreatment. The first step in sensor fabrication is

the reduction of the probe DNA (200 μM) for 1 h in a solution of 10 mM tris-(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) prepared in 1 M NaCl/10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. Then, the modified electrode surface was covered with a 20 μL drop of the respective probe solution (prepared in 150 mM NaCl/50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0) incubated for 1 h and rinsed with distilled, deionized water to remove the excess of DNA probe. In order to displace nonspecifically adsorbed DNA and passivate the remaining electrode area, was subsequently incubated for 1.5 h in a 20 μL drop of 2 mM 6-mercaptohexanol solution (also prepared in 150 mM NaCl/50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0), followed by further rinsing with deionized water. Finally, the electrodes were stored in the phosphate buffer solution for 30 min before their use.

Electrochemical Measurements and binding curves

The sensors were interrogated at intervals of 5 min in the buffer solution until a stable current peak was obtained (typically after 30 min). Then, the sensor response was measured by incubating the electrodes for 1 h in the appropriate target DNA concentration. The ratio between the stabilized current peak in the presence of target DNA and the current peak in the absence of target DNA gives the measure of the signal suppression caused by the target. All experiments were performed using a PalmSens potentiostat instrument using a CH8 multiplexer that allows the measurement of eight different screen printed electrodes at the same time. Square wave voltammetry (SWV) was recorded from -0.4 V to -0.05 V versus Ag/AgCl reference electrode using a 25 mV potential at a frequency of 50 Hz. All experiments were conducted in 150 mM NaCl/50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0. Binding curves were obtained by interrogating each sensor in buffer solution to obtain the background signal and then at different target concentrations until signal suppression was stable. The actual signal changes have been normalized on a 0-100 scale to provide more clear interpretation of the results.

Calculation of Probe Surface Density

Probe surface-density (the number of electroactive probe DNA moles per unit area of the electrode surface) was determined using a previously established method¹⁵. In brief, the measured charge acquired from the reduction of the RuHex that is electrostatically associated with the negatively charged backbone of the surface-bound probes is used to calculate the number of moles of phosphate (and thus number of probe DNAs) immobilized on the surface. More specifically, chronocoulometric experiments were acquired using 10 mM Tris buffer (pH 7.4) or 0.2 mM RuHex in 10 mM Tris buffer (pH 7.4). Electrodes were immersed in the respective solution for 10 min prior to the experiment. Two-step coulometry was performed stepping from 0.1 to -0.4 V versus Ag/AgCl with a pulse period of 250 ms and a sample time of 0.001 s. The surface excess of RuHex at a DNA-modified electrode is determined from the difference in intercepts for the response in the absence and presence of redox marker¹⁵.

The density with which probe are packed on the electrode surface is controlled by varying the concentration of thiolated oligonucleotide employed during sensor fabrication. Employing fabrication concentrations of 0.01–2 μM we reproducibly achieve probe densities ranging from 0.37×10^{-12} to 3.23×10^{-11} moles/cm².

9. GLOSARIO DE ABREVIATURAS

A

A: adenina.

Ab: anticuerpo/ antibody.

ACS: síndrome de enfermedad coronaria aguda.

AE: electrodo auxiliar.

AEDP: amino-2-etil-1,3-propanodiol.

Ag: antígeno/antigen.

AgNPs: nanopartículas de plata.

AIDS: síndrome de inmunodeficiencia adquirida/ acquired immunodeficiency syndrome.

AMI: infarto agudo de miocardio/ acute myocardial infarction.

ANP: péptido natriurético auricular.

Anti-C-LytA: anticuerpo específico del gen LytA.

AntiCRP: anticuerpo específico de la CRP.

AnticTnT-HRP: anticuerpo monoclonal conjugado con peroxidasa específico de la troponina T.

AntiLp(a): anticuerpo específico de la lipoproteína (a).

AntiNT-proBNP-HRP: anticuerpo específico monoclonal de NT-proBNP conjugado con peroxidasa.

Anti-PLY: anticuerpo monoclonal específico de neumolisina.

AntiProtA: anticuerpo policlonal específico de la proteína A del *S. aureus*.

AntiS37: anticuerpo específico del serotipo 37 procedente de un suero policlonal de conejo.

AntiS37-HRP: anticuerpo específico del serotipo 37 marcado con peroxidasa.

Anti-TEPC 15: anticuerpo específico de la fosforilcolina.

AP: fosfatasa alcalina.

aPCR: reacción en cadena de la polimerasa asimétrica.

Apo(a): apolipoproteína-a.

ApoB100-ox: apolipoproteína B100 oxidada.

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos.

ASIC: circuito integrado para aplicaciones específicas.

ASV: voltamperometría de redisolución anódica.

AU: unidades arbitrarias.

AuE: electrodo de oro.

AuNPs: nanopartículas de oro.

B

β-gal: β-galactosidasa.

Biotin: biotina.

Biotin-antiCRP: anticuerpo específico de la CRP conjugado con biotina.

Biotin-antiTnT: anticuerpo monoclonal biotinilado específico de la troponina T.

Biotin-antiLp(a): anticuerpo específico de Lp(a) conjugado con biotina.

BNP: péptido natriurético tipo B.

Bp: pares de bases/ base pairs.

BRCA1: secuencias del gen del cáncer de mama.

BSA: albúmina de suero bovino.

C

C: citosina.

C6-OH: 6-mercapto-1-hexanol.

CBs: biomarcadores cardiacos/cardiac biomarkers.

CEA: antígeno carcinoembrionario.

CECT: Colección Española de cultivos Tipo.

cfu: unidades formadoras de colonias/ colony forming units.

CH: región constante de la cadena pesada de un anticuerpo.

CK: creatina quinasa.

CL: región constante de la cadena ligera de un anticuerpo.

CNP: péptido natriurético tipo C.

CNTs: nanotubos de carbono.

COP: cyclo-olefin polymer.

CRP: proteína C reactiva/C-reactive protein.

CSP_/_ytA: sonda de captura del gen *lytA* biotinilada.

CSV: voltamperometría de redisolución catódica.

cTn: complejo de troponina cardiaca.

cTnI: troponina I cardiaca.

cTnT: troponina T cardiaca/cardiac troponin T.

CV: voltamperometría cíclica.

CVAs: accidentes vasculares cerebrales.

CVD: enfermedad cardiovascular/cardiovascular disease.

CVR: riesgo cardiovascular.

D

daPCR: reacción en cadena de la polimerasa asimétrica directa/direct asymmetric polymerase chain reaction.

DMAA: N-(4-dimetilaminofenil)-acrilamida.

DNA: ácido desoxirribonucleico/deoxyribonucleic acid.

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato.

DPV: voltamperometría diferencial de impulsos.

DR: rango dinámico.

DTSP: ácido 3,3'-ditiopropiónico di(N-succinimidil) éster.

E

EC₅₀: concentración que da lugar al 50 % de inhibición respecto del valor máximo.

ECL: electroquimioluminiscencia/electrochemiluminiscence.

E. coli: *Escherichia coli*.

EDC: N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida/N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético (sal disódica).

EIA: inmunoensayo enzimático.

EIS: espectroscopia de impedancia electroquímica.

ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas/Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay.

F

Fab: fragmento del anticuerpo de unión al antígeno.

Fc: fragmento cristizable del anticuerpo.

Fc-CsNPs: nanopartículas de quitosán y ferroceno.

fenil-gal: fenil β -D-galactosidasa.

FET: transistor de efecto campo.

FSP_ *lytA*: cebador directo del gen *lytA*.

G

G: guanina.

GA: glutaraldehído.

GCE: electrodo de carbono vitrificado.

GIE: electrodos interdigitados de oro.

GONRs: nanocintas de grafeno.

GPMS: 3-glicidoxipropiltrimetoxisilano.

H

HAbs: anticuerpos humanos.

HAMAs: anticuerpos anti-ratón humanos.

hCG: gonadotropina coriónica humana.

HFABP: proteína transportadora de ácidos grasos.

HIV: Human immunodeficiency virus.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

HQ: hidroquinona.

HRP: peroxidasa de rábano/horseradish peroxidase.

HS-NTA: N-[N α ,N α -bis(carboximetil)-L-lisina]-12-mercaptododecanamida/N-[N α ,N α -bis(carboxymethyl)-L-lysine]-12-mercaptododecanamide.

I

IgA: inmunoglobulina A.

IgG: inmunoglobulina G.

Igs: inmunoglobulinas.

IL: intervalo lineal.

ImE: electrodo de inmovilización.

IL6: interleucina 6.

IMS: separación inmunomagnética.

3-IP: 3-indosil fosfato.

ITO: óxido de indio y estaño.

L

LB-Broth: medio de cultivo bacteriano Luria-Bertani Broth.

LD: límite de detección/limit of detection.

LDL: lipoproteínas de baja densidad.

LFI: inmunocromatografía de flujo lateral.

LOC: tecnología "lab on a chip"/lab on a chip technology.

Lp(a): lipoproteína-a/lipoprotein-a.

Lp(a)-ox: lipoproteína a oxidada.

LSV: voltamperometría de barrido lineal.

/lytA: autolisina *lytA*/autolysin *lytA*.

M

MAbs: anticuerpos monoclonales.

MB: azul de metileno.

MBs: partículas magnéticas/magnetic beads.

MES: Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico.

m-GEC: magnetocompuesto grafito-epoxi.

MHDA: ácido mercaptohexadecanoico.

MI: impresión molecular.

miRNA: microRNA.

MIP: polímero de impresión molecular.

mIU: mili-unidad internacional.

MM: secuencia de DNA con alguna base desapareada.

MPA: ácido 3-mercaptopropanoico.

MR: material de referencia.

mRNA: ácido ribonucleico mensajero.

MRSA: *S. aureus* resistente a la meticilina.

MS: espectrometría de masas.

MWCNTs: nanotubos de carbono de pared múltiple.

N

NADP: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato.

Nb: nanoanticuerpo (nanobody).

NT-proBNP: péptido natriurético cerebral N-terminal/amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide.

O

OEG: oligo-etilenglicol.

Os bpy: complejo de Os-bipiridilo.

P

PAbs: anticuerpos policlonales.

PANi: polianilina.

PB: azul de Prusia.

PBS: disolución reguladora de fosfato.

PBST: disolución reguladora de fosfato suplementada con Tween®20.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa/polymerase chain reaction.

PCT: procalcitonina.

PDMS: polidimetilsiloxano.

PEI: polietilenimina.

PGE: electrodo de grafito pirolítico.

Ply: neumolisina.

PM: secuencia de DNA perfectamente complementaria.

PMMA: polimetilmetacrilato.

POCT: pruebas de diagnóstico en el sitio de atención/point of care testing.

ProtA: proteína A/protein A.

ProtG: proteína G.

PSA: antígeno específico de la próstata.

p53: proteína supresora de tumores.

Q

QCM: microbalanza de cristal de cuarzo.

QDs: quantum dots (puntos cuánticos).

R

RbIgG: inmunoglobulina G de conejo.

RE: electrodo de referencia.

RIA: radioinmunoensayo/radioimmunoassay.

RNA: ácido ribonucleico.

RSD: desviación estándar relativa/ relative standard deviation.

RSP_ *lytA*: cebador reverso del gen *lytA*.

RT: transcriptasa inversa.

RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa.

S

S. aureus: *Staphylococcus aureus*.

S. choleraesuis: *Salmonella choleraesuis*.

S. mitis: *Streptococcus mitis*.

S. oralis: *Streptococcus oralis*.

S. pneumoniae: *Streptococcus pneumoniae*.

S. pseudopneumoniae: *Streptococcus pseudopneumoniae*.

S. sanguinis: *Streptococcus sanguinis*.

S. viridans: *Streptococcus viridans*.

SAMs: monocapas autoensambladas.

SEA: enterotoxina A de *S. aureus*.

SEB: enterotoxina de *Staphylococcus*.

SGM: *Streptococcus* del grupo *Mitis*.

SiNW: nanoalambre de silicio.

SNPs: polimorfismos únicos.

SPAuEs: electrodos serigrafiados de pasta de oro/screen-printed gold electrodes.

SPCEs: electrodos serigrafiados de carbono/screen-printed carbon electrodes.

SPdCEs: electrodos serigrafiados duales de carbono/screen-printed dual carbon electrodes.

SPEs: electrodos serigrafiados/screen-printed electrodes.

SPR: resonancia de plasmón superficial/surface plasmon resonance.

Strp: estreptavidina/streptavidin.

Strp-AP: estreptavidina marcada con fosfatasa alcalina.

Strp-HRP: estreptavidina-peroxidasa de rábano/streptavidin-peroxidase.

Sulfo-NHS: N-hidroxisulfosuccinimida/N-hydroxysulfosuccinimide.

SWASV: voltamperometría de redisolución por onda cuadrada.

SWCNT: nanotubos de carbono de pared simple.

SWV: voltamperometría de onda cuadrada/square wave voltammetry.

T

T: timina.

TCEP: clorhidrato de tris-(2-carboxietil)fosfina.

TiP: fosfato de titanio.

TIRF: fluorescencia de reflexión interna total.

TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina/3,3',5,5'-tetramethylbenzidine.

TNF α : factor de necrosis tumoral α .

TP: disolución reguladora de fosfato.

Tris-HCl: (clorhidrato de tris(hidroximetil)-aminometano.

TSA: medio de cultivo bacteriano Tryptic Soy Agar.

TSB: medio de cultivo bacteriano Tryptic Soy Broth.

TSP $_{lytA}$: sonda diana del gen *lytA* biotinilada.

TTF: tetratiafulvaleno/tetrathiafulvalene.

tTG: transglutaminasa tisular.

U

UC: ultracentrifugación.

UTI: infección en el tracto urinario.

UV: ultravioleta.

V

VH: región variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

Vis: visible.

VL: región variable de la cadena ligera de un anticuerpo.

W

WE: electrodo de trabajo.

